



**HAL**  
open science

# Décrypter les mécanismes d'adaptation au froid de *Listeria monocytogenes* en présence de lipides insaturés alimentaires

Aurore Quilleré

► **To cite this version:**

Aurore Quilleré. Décrypter les mécanismes d'adaptation au froid de *Listeria monocytogenes* en présence de lipides insaturés alimentaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASB037 . tel-04880298

**HAL Id: tel-04880298**

**<https://theses.hal.science/tel-04880298v1>**

Submitted on 10 Jan 2025

**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.

# Décrypter les mécanismes d'adaptation au froid de *Listeria monocytogenes* en présence de lipides insaturés alimentaires

*Deciphering the mechanisms of cold adaptation  
when Listeria monocytogenes uses food-unsaturated lipid*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 : Agriculture, Alimentation,  
Biologie, Environnement, Santé (ABIES)  
Spécialité de doctorat : Microbiologie  
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'UMR **Institut MICALIS** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech), sous la direction de **Florence DUBOIS-BRISSONNET**, Professeure, et le co-encadrement de **Maud DARSONVAL**, Maîtresse de conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 3 octobre 2024, par

**Aurore QUILLERÉ**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Pascal PIVETEAU</b> Directeur de recherche, INRAE (centre Bretagne-Normandie)	Président
<b>Nabila HADDAD</b> Maîtresse de conférences (HDR), ONIRIS	Rapporteuse & Examinatrice
<b>Michel HÉBRAUD</b> Directeur de recherche, INRAE (centre Clermont-Auvergne)	Rapporteur & Examinateur
<b>Nadia OULAHAL</b> Professeure, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice

**Titre :** Décrypter les mécanismes d'adaptation au froid de *Listeria monocytogenes* en présence de lipides insaturés alimentaires

**Mots clés :** *Listeria* / Surcroissance / Acide gras exogène / Basse température / Analyse transcriptomique / Composition membranaire

**Résumé :** Les pathologies infectieuses d'origine alimentaire, en particulier les listérioses avec leur fort taux de létalité, demeurent un véritable problème de santé publique. Ubiquitaire et psychrotrophe, *Listeria monocytogenes* est fréquemment présente dans les environnements alimentaires (matières premières, chaîne de production) et peut contaminer de nombreuses denrées, telles que les produits prêts à consommer. Pour cette catégorie de produits, la réfrigération est la principale méthode permettant de maîtriser la croissance du pathogène et de garantir la sécurité sanitaire du produit. Une étude préliminaire de l'équipe a montré que plusieurs souches de *L. monocytogenes* sont capables d'incorporer des acides gras exogènes dans leur membrane, ce qui provoque un changement dans leur capacité de croissance à basse température. En effet, les acides gras saturés (AGS) limitent la croissance, alors que les acides gras insaturés (AGI) la favorise. La tendance actuelle visant à privilégier les AGI dans les aliments au détriment des AGS pour répondre à des recommandations nutritionnelles pourrait donc augmenter le risque de listériose des produits réfrigérés riches en lipides.

Dans ce contexte, le but de ce travail était de mieux comprendre le comportement de *L. monocytogenes* à basse température dans des environnements riches en acides gras. Dans un premier temps, nous avons caractérisé, génotypiquement et phénotypiquement, la souche Lm208 qui présentait le taux de croissance le plus important à basse température en présence d'acide oléique dans l'étude préliminaire. Le génome a été séquencé, annoté, et enrichi. Nous avons ensuite complété l'étude phénotypique en évaluant la réponse de *L. monocytogenes* à différents acides gras en fonction de leur structure (longueur de chaîne, insaturations). Les AGI induisant, après incorporation, une température de fusion des phospholipides membranaires comprise entre 18°C et 23°C (AGI à 18 carbones) permettent la plus importante augmentation de croissance de Lm208 à basse température.

Dans un deuxième temps, nous avons mené des études transcriptomiques non ciblées et ciblées pour mettre en évidence l'expression de gènes en relation avec le phénotype étudié. L'analyse RNA-seq globale sur quatre conditions (croissance avec ou sans supplémentation en acide oléique à 5°C et 37°C) a permis de sélectionner les gènes impliqués dans ce phénomène de surcroissance. Une analyse par RT-qPCR a ensuite été conduite sur les gènes ciblés en élargissant le panel des conditions de culture testées. Parmi les gènes d'intérêt, *fabK* impliqué dans la voie de biosynthèse des acides gras, *cheY* et *flaA* impliqués dans la mobilité et l'assemblage des flagelles sont respectivement sur-exprimés ou sous-exprimés en présence d'AGI ou AGS. L'expression différentielle de *fabK* pourrait avoir un lien avec la régulation de la voie de biosynthèse des AGI versus AGS. La présence de flagelles très longs et nombreux en présence d'AGI à basse température a été confirmée par microscopie électronique à transmission. Ce phénotype remarquable pourrait avoir des conséquences sur la capacité de *L. monocytogenes* à former des biofilms et à persister dans les environnements de production.

En conclusion, ce travail a confirmé l'effet promoteur de croissance de nombreux AGI sur *L. monocytogenes* à basse température, et a mis en évidence un phénotype associé correspondant à la synthèse de flagelles longs et nombreux, ce qui peut avoir d'importantes conséquences en termes de sécurité sanitaire des aliments riches en lipides et des environnements de production associés.

**Title :** Deciphering the mechanisms of cold adaptation when *Listeria monocytogenes* uses food-unsaturated lipid

**Keywords :** *Listeria* / Overgrowth / Exogenous fatty acid / Low temperature / Transcriptome analysis / Membrane composition

**Abstract :** Food-borne infectious diseases, especially listeriosis with its high case fatality rate, remain a real public health problem. Being ubiquitous and psychrotrophic, *Listeria monocytogenes* is frequently found in food environments (raw materials, production chain), and can contaminate numerous foodstuffs, such as ready to eat products (RTE). For RTE products, refrigeration is the main method for controlling pathogen growth and guaranteeing product food safety. A previous study performed in our laboratory showed that several strains of *L. monocytogenes* can incorporate exogenous fatty acids into their membranes, modifying their ability to grow at low temperature. Saturated fatty acids (SFA) limit growth, while unsaturated fatty acids (UFA) promote it. This ability could question new trends in reformulating food with unsaturated fatty acids to fit with nutritional claims that could increase the risk of listeriosis in lipid-rich refrigerated products.

In this context, this work aimed at understanding the behavior of *L. monocytogenes* at low temperatures in fatty acid rich environments. First, we characterized, genotypically and phenotypically, Lm208, the strain that has shown the highest growth rate at low temperatures in the presence of oleic acid in the preliminary study. The genome was sequenced, annotated, and enriched. We then completed the phenotypic characterization by evaluating the behavior of *L. monocytogenes* in the presence of different FAs according to their structure (chain length, unsaturation). UFAs inducing, after incorporation, a membrane phospholipid melting temperature between 18 and 23°C (18 carbon UFA) enabled the greatest increase in Lm208 growth at low temperature.

Secondly, we performed non targeted and targeted transcriptomic studies to study the gene expression related to the observed phenotype. Global RNA-seq analysis over four conditions (growth with or without oleic acid supplementation at 5°C and 37°C) enabled us to select the genes involved in this overgrowth phenomenon. RT-qPCR analysis was then carried out on the targeted genes, enlarging the range of culture conditions tested. Among the genes of interest, *fabK*, involved in the fatty acid biosynthesis pathway, and *cheY* and *flaA*, involved in flagellar mobility and assembly, were respectively over and under expressed in the presence of UFA or SFA. The differential expression of *fabK* could be linked to the regulation of the UFA versus SFA biosynthetic pathway. The presence of very long and numerous flagella in the presence of UFA at low temperatures was observed by transmission electron microscopy. This remarkable phenotype could be involved in the ability of *L. monocytogenes* to form biofilms and persist in production environments.

# AVANT-PROPOS

---

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR 1319 MICALIS MICrobiologie de l'Alimentation au Service de la Santé associant l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), AgroParisTech et l'Université Paris-Saclay, sur le site de Jouy-en-Josas, au sein de l'équipe B3D Biofilms et Communautés Spatialement Organisées. Il a donné lieu aux publications suivantes :

## Publications dans des revues à comité de lecture

Touche, C., Hamchaoui, S., **Quilleré, A.**, Darsonval, M., and Dubois-Brissonnet, F. (2023). Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane. *Food Microbiology*, 110, 104170. doi: 10.1016/j.fm.2022.104170 (disponible en [annexe](#) – Annexe n°1)

**Quilleré, A.**, Darsonval, M., Papadochristopoulos, A., Amoros, A., Nicolas, P., and Dubois-Brissonnet, F. (2024). Deciphering the impact of exogenous fatty acids on *Listeria monocytogenes* at low temperature by transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2024.1441784

Darsonval, M., Gardon, H., **Quilleré, A.**, Velge, P., Guillier, L., and Dubois-Brissonnet, F. (2024). High-quality genome assembly of *Listeria monocytogenes* Lm208 (CNL895805): a nondomestic strain able to grow faster in the presence of exogenous unsaturated fatty acids at low temperature. *Microbiology Resource announcements*. (soumis).

**Quilleré, A.**, Amoros, A., Darsonval, M., and Dubois-Brissonnet, F. (2024). Differential impact of several exogenous fatty acids on membrane composition and growth abilities of *Listeria monocytogenes* at low temperature. (en cours de soumission)

## Communication orale

### FOODMICRO 2022 CONFERENCE – Next Generation Challenges in Food Microbiology



Quilleré, A., Papadochristopoulos, A., Nicolas, P., Darsonval, M., and Dubois-Brissonnet, F. (Aug 2022). Transcriptomic analysis of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature in presence of exogenous unsaturated fatty acids. FoodMicro2022, Athens, Greece.

## Communication par poster

### ISEKI-FOOD CONFERENCE – Next Generation of Food Research, Education and Industry



Quilleré, A., Darsonval, M., Papadochristopoulos, A., Nicolas, P., and Dubois-Brissonnet, F. (Jul 2023). Unraveling the role of oleic acid in *Listeria monocytogenes* cold adaptation by transcriptomic analysis. 7th International Iseki-food conference, Paris-Palaiseau, France. (disponible en annexe – Annexe n°2)

# REMERCIEMENTS

---

L'écriture de ces dernières pages, malgré qu'elles soient les premières lues, signe la fin de ces trois années de thèse. Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes que je remercie sincèrement (et j'espère que celles que j'aurais eu l'indélicatesse d'oublier pourront me pardonner).

Tout d'abord, j'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury : Nabila HADDAD, maître de conférences à ONIRIS, et Michel HEBRAUD, directeur de recherche à l'INRAE de Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Nadia OULAHAL, professeure à l'Université Lyon 1, et Pascal PIVETEAU, directeur de recherche à l'INRAE de Bretagne-Normandie, d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier Florence DUBOIS-BRISSONNET, professeure à AgroParisTech et directrice de thèse, ainsi que Maud DARSONVAL, maître de conférences à AgroParisTech et co-encadrante, de m'avoir laissé la chance de découvrir ce qu'est le travail de la thèse. Je les remercie pour leur aide, leur soutien, leur patience et leurs conseils. Je vous remercie pour ces trois années, celles-ci furent très formatrices.

Cette thèse a été réalisée à l'unité MICALIS - MICrobiologie de l'ALLimentation au Service de la Santé - sur le site de l'INRAE de Jouy-en-Josas, au sein de l'équipe B3D - Biofilms et Communautés Spatialement Organisées. Je remercie Romain BRIANDET, responsable de l'équipe, de m'avoir accueilli ainsi que tous les membres : Marie-Françoise, Julien, Alban, Hadi, Yasmine, Virgile, Pierre, Raphaël, Arthur, Cécile et Vincent. Je pense également aux anciens membres de l'équipe : Dominique, Hugo, Mathilde, Inès, Clémence... Je vous remercie pour votre accueil.

Je pense également à toutes les personnes de l'unité que j'ai rencontrées dans

les couloirs, ainsi que les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ce travail, en particulier Pierre NICOLAS, directeur de recherche à l'unité MalAGE à l'INRAE de Jouy-en-Josas, pour son aide précieuse dans l'analyse des données transcriptomique et son œil critique, ainsi que Christine PECHOUX-LONGIN, ingénieure de recherche à l'unité GABI sur la plateforme MIMA2, pour ces longues heures d'observations au microscope.

J'ai une pensée particulière pour Marina GREGOIRE, assistante ingénieur à l'unité MICALIS, et Mylène BOULAY, technicienne de recherche à l'unité MICALIS, qui m'ont accompagné tout au long de ce travail et qui m'ont fait découvrir que le monde de la recherche ne se cantonne pas seulement aux manipulations de laboratoire, mais également à tant d'autres choses. Les résultats finaux ne sont que la partie visible de l'iceberg.

Je tiens également à remercier Louis COROLLER, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Julien PARINET, chercheur à l'ANSES de Maisons-Alfort, et Pascal PIVETEAU, directeur de recherche à l'INRAE de Bretagne-Normandie, qui ont accepté de participer à mon comité de suivi de thèse. Je les remercie pour leur bienveillance, leurs commentaires constructifs et leurs suggestions précieuses. Louis, je te remercie particulièrement, tu as suivi mes aventures de stage de Master 2<sup>ème</sup> année, ce fut un réel plaisir d'avoir ton soutien au cours de cette thèse.

En parlant de mon stage Master 2<sup>ème</sup> année, je tiens à remercier chaleureusement Anne-Gabrielle MATHOT, maître de conférences à l'Université de Bretagne Occidentale, et Louis « Junior » DELAUNAY de m'avoir initié au monde de la recherche. Je pense également aux membres de l'équipe du LUBEM de Quimper de cette année-là, Loona, Manon, Marion, Fabien, Matthew, Clément, Noémie, Agathe et les autres que j'oublie, qui m'ont soutenu tout au long de ma recherche de thèse et pendant tout le processus de recrutement. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Enfin, la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien



collectif, l'encouragement et le dévouement de mes proches.

Je pense à Chloé, ma binôme, avec qui j'ai partagé mes années de master qui auraient été bien fades sans toi. Tu as suivi mes aventures de thèse jusqu'à la fin, dans quelques mois, cela sera ton tour ! (t'as intérêt à m'inviter !) Je t'envoie toutes mes bonnes ondes.

Je remercie Éliisa et Joffrey, mes normands préférés, d'avoir été là malgré la distance et d'avoir écouté mes lamentations. L'air normand m'a vraiment permis de me changer les idées. Vous êtes géniaux. Mention spéciale pour Sophie et ses fabuleux fromages qui ont rendu ces longues heures de rédaction plus agréables.

Je remercie Pauline, même si plusieurs centaines de kilomètres nous séparent, tu as réussi à me changer les idées. Merci de m'avoir emmené à ces fabuleux concerts que je n'aurais jamais fait sans toi (mon compte en banque, lui, ne te remercie pas), j'attends le prochain, que dis-je les prochains, avec impatience.

Je remercie particulièrement Florent, d'avoir été à mes côtés, de m'avoir écouté, conseillé et épaulé. Tu as été d'un soutien inconditionnel. Cette thèse n'a pas été de tout repos, mais nous avons maintenu le cap. Merci également à Peanut et ses 5 kg d'amour, tu ne dois rien comprendre, mais tes ronrons ont su m'apporter de la sérénité (tes réveils matinaux à coup de léchage de nez un peu moins).

Papa, Maman, une pensée particulière pour vous. Je vous remercie sincèrement de m'avoir soutenu tout au long de cette longue période qu'est la thèse et d'avoir toujours cru en moi. Merci de m'avoir écouté de longues heures alors que mon travail n'était pas votre domaine de prédilection. Papa, merci pour les balades en forêt et les sessions bricolage/bois, cela m'a permis de mettre mon cerveau sur le mode « off » pendant quelques temps. Maman, merci pour tous tes petits plats réconfortants et la logistique, cela a été d'une grande aide. Ces quelques lignes ne pourront pas suffire pour exprimer toute ma gratitude. Cette thèse, c'est aussi un peu la vôtre et j'espère sincèrement qu'à l'issue de ce travail, vous pourrez m'appeler « Docteur Crapaud ».

# TABLE DES MATIERES

---

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	13
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
CHAPITRE 1.....	19
<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....	19
1.1 Caractéristiques générales et taxonomie.....	21
1.1.1 Caractéristiques phénotypiques.....	21
1.1.1.1 Morphologie.....	21
1.1.1.2 Métabolisme.....	21
1.1.1.3 Effet de la température, du pH et de l'activité de l'eau.....	22
1.1.2 Taxonomie du genre <i>Listeria</i> .....	22
1.2 Habitat et réservoir.....	28
1.2.1 Prévalence dans l'environnement et les matières premières.....	28
1.2.2 Prévalence dans les environnements de production alimentaire.....	29
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments.....	31
1.3.1 Prévalence dans les aliments.....	31
1.3.2 Comportement dans les matrices alimentaires complexes.....	33
1.4 La listériose.....	35
1.4.1 Pathogénicité chez l'animal.....	35
1.4.2 Pathogénicité chez l'Homme.....	36
1.4.2.1 Population à risque.....	36
1.4.2.2 Exposition, dose infectieuse et incubation.....	38
1.4.2.3 Mécanisme d'infection chez l'Homme.....	39
1.4.2.4 Traitement de la listériose.....	45
1.4.3 Surveillance de la maladie chez l'Homme.....	46
1.5 Sécurité microbiologique des aliments : focus sur <i>Listeria monocytogenes</i> .....	48
1.5.1 Le Paquet Hygiène.....	48

1.5.2	Le Plan de Maîtrise Sanitaire .....	50
1.5.3	Analyse microbiologique des aliments : cas de <i>L. monocytogenes</i> .....	51
1.5.4	Système de surveillance de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments en France .....	53
<b>CHAPITRE 2 .....</b>		<b>56</b>
<b>LA MEMBRANE BACTERIENNE ET SA REGULATION .....</b>		<b>56</b>
2.1	Composition de la membrane cytoplasmique, biosynthèse et régulation .....	58
2.1.1	Structure et composition générale de la membrane cytoplasmique.....	58
2.1.2	Les lipides complexes, composants clés de la membrane.....	59
2.1.2.1	Les acides gras membranaires.....	60
2.1.2.2	Point de fusion et fluidité membranaire.....	64
2.1.3	Biosynthèse des lipides membranaires .....	65
2.1.3.1	Biosynthèse des acides gras .....	65
2.1.3.2	Biosynthèse des phospholipides.....	69
2.2	Régulation de la composition membranaire en fonction de stress environnementaux.....	71
2.2.1	Le stress bactérien .....	71
2.2.2	Aspects mécanistiques de la régulation de la biosynthèse membranaire.....	75
2.2.3	Adaptation membranaire face à la température .....	79
2.2.4	Adaptation membranaire face à des composés hydrophobes .....	81
<b>CHAPITRE 3 .....</b>		<b>83</b>
<b>IMPACT DES ACIDES GRAS EXOGENES.....</b>		<b>83</b>
3.1	Les lipides des aliments .....	84
3.2	Système d'incorporation des acides gras exogènes .....	87
3.2.1	Chez les bactéries à Gram négatif .....	87
3.2.2	Chez les bactéries à Gram positif.....	89
3.3	Comportement des bactéries face aux acides gras exogènes .....	92
3.3.1	Effet antimicrobien des acides gras exogènes.....	92
3.3.2	Effets positifs des acides gras exogènes.....	93
3.3.2.1	Contournement de l'action des antimicrobiens visant la FASII.....	94
3.3.2.2	Effet promoteur des AGI à basse température.....	95
3.3.2.3	Effet des AGI sur la formation de biofilms .....	97
<b>CHAPITRE 4 .....</b>		<b>99</b>
<b>EXPLORATION DU GENOME ET DU TRANSCRIPTOME.....</b>		<b>99</b>
4.1	La génomique.....	101

4.1.1	Généralités.....	101
4.1.2	Séquençage de L'ADN.....	102
4.1.3	Analyse des données de séquençage.....	105
4.2	La transcriptomique.....	106
4.2.1	Généralités.....	106
4.2.2	Préparation d'échantillon pour une étude du transcriptome.....	107
4.3	Méthodes d'exploration du transcriptome .....	108
4.3.1	Quantification d'un fragment d'ARN cible par RT-qPCR.....	108
4.3.1.1	Technologie de quantification .....	109
4.3.1.2	Notion de cycle seuil.....	111
4.3.1.3	Analyse des données de qPCR .....	112
4.3.2	Séquençage des ARN ou RNA-sequencing.....	115
4.3.2.1	Analyse des données de RNA-seq .....	116
4.3.2.2	Évolution des techniques de RNA-sequencing .....	118
	<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>121</b>
	<b>PARTIE 1.....</b>	<b>122</b>
	<b>CARACTERISATIONS GENOTYPIQUE ET PHENOTYPIQUE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> LM208.....</b>	<b>122</b>
I.1.	Article 1 – High-quality genome assembly of <i>Listeria monocytogenes</i> Lm208 (CNL895805): a wild-type strain able to grow faster in the presence of exogenous unsaturated fatty acids at low temperature.....	125
1.1	Abstract.....	125
1.2	Introduction.....	126
1.3	Genomic structure and quality metrics .....	126
1.4	Automatic annotation and improvements with comparative genome analysis of <i>L. monocytogenes</i> Lm208 with domestic reference strains.....	128
1.5	Deep annotation of FASII and fatty acid metabolism-related genes .....	131
1.6	Data availability.....	134
1.7	References.....	134
I.2.	Article n°2 – Differential impact of several exogenous fatty acids on membrane composition and growth abilities of <i>Listeria monocytogenes</i> at low temperature.....	135
2.1	Abstract & Keywords.....	135
2.2	Introduction.....	136
2.3	Materials and Methods.....	138
2.3.1	Chemicals.....	138

2.3.2	Bacterial strain and culture conditions.....	138
2.3.3	Determination of the growth rate .....	138
2.3.4	Membrane fatty acid analysis .....	139
2.3.5	Statistics .....	140
2.4	Results.....	140
2.4.1	The addition of BSA in TSB does not change the growth rate and membrane composition.....	140
2.4.2	The concentration of #C18:1 impacts the growth rate and the membrane composition.....	141
2.4.3	The type of #FA impacts the growth rate and the membrane composition .....	142
2.5	Discussion .....	146
2.6	Conclusion .....	150
2.7	References.....	151
PARTIE 2.....		152
IMPACT DES ACIDES GRAS EXOGENES SUR LE TRANSCRIPTOME DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....		152
II.1.	Optimisation de la méthode d'analyse du transcriptome.....	155
1.1	Optimisation de l'exploitation des résultats bruts de l'analyse non ciblée du transcriptome .....	155
1.2	Optimisation de la méthode de RT-qPCR pour le suivi d'expression de gènes cibles .....	159
1.2.1	Préparation du matériel biologique.....	159
1.2.1.1	Extraction des ARN totaux .....	159
1.2.1.2	Évaluation du traitement d'élimination de l'ADNg .....	160
1.2.2	Design et évaluation <i>in silico</i> et <i>in vitro</i> des amorces.....	161
1.2.2.1	Évaluation <i>in silico</i> des couples d'amorces.....	162
1.2.2.2	Évaluation <i>in vitro</i> des couples d'amorces.....	163
1.2.3	Choix des gènes de référence et évaluation de leur stabilité.....	166
1.2.4	Analyse des données de RT-qPCR.....	168
II.2.	Article – “Deciphering the impact of exogenous fatty acids on <i>Listeria monocytogenes</i> at low temperature by transcriptome analysis” .....	169
2.1	Abstract & Keywords.....	169
2.2	Introduction.....	170
2.3	Materials and Methods.....	173
2.3.1	Bacterial strain and culture conditions.....	173
2.3.2	Cell harvest at different time points.....	173
2.3.3	RNA extraction.....	174

2.3.4	RNA sequencing and data analysis.....	175
2.3.5	Clustering of gene expression profile.....	175
2.3.6	Functional categorization of differentially expressed genes.....	176
2.3.7	RT-qPCR and data analysis.....	178
2.3.8	Membrane fatty acid analysis.....	179
2.3.9	Transmission electron microscopy.....	180
2.3.10	Statistics.....	180
2.4	Results.....	181
2.4.1	Global assessment of the <i>Listeria monocytogenes</i> transcriptome.....	181
2.4.2	Deep assessment of the FASII pathway in the global transcriptome.....	186
2.4.3	Expression profile of five genes of interest by RT-qPCR.....	187
2.4.4	Membrane fatty acid profile.....	189
2.4.5	Cell and flagella morphologies by TEM.....	190
2.5	Discussion.....	192
2.6	Conclusions and perspectives.....	196
2.7	References.....	196
II.3.	Résultats complémentaires.....	197
3.1	Matériels et méthodes.....	198
3.2	Résultats.....	198
3.3	Discussion.....	200
3.4	Conclusion.....	204
	<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>205</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>212</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>250</b>

# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

## A

ACC	Acétyl-Coenzyme A carboxylase
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i>
ACP (PCA)	Analyse en Composante Principale ( <i>Principal Composante Analysis</i> )
ActA	Actin assembly-inducing protein A
ADI	Système arginine dihydrolase ( <i>arginine deiminase</i> )
ADN (DNA)	Acide DésoxyriboNucléique ( <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> )
ADNc (cDNA)	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire ( <i>complementary DeoxyriboNucleic Acid</i> )
ADNg (gDNA)	Acide DésoxyriboNucléique génomique ( <i>genomic DeoxyriboNucleic Acid</i> )
AESA (EFSA)	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments ( <i>European Food Safety Authority</i> )
AG (FA)	Acide Gras ( <i>Fatty Acid</i> )
AGB (BFA)	Acide Gras Branchés ( <i>Branched Fatty Acid</i> )
AGI (UFA)	Acide Gras Insaturé ( <i>Unsaturated Fatty Acid</i> )
AGS (SFA)	Acide Gras Saturé ( <i>Saturated Fatty Acid</i> )
ALA	Acide $\alpha$ -linoléinique
ALOA	<i>Listeria</i> chromogenic Agar base according to Ottaviani and Agosti
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
Anses	Agence National de Sécurité Sanitaire
ARN (RNA)	Acide RiboNucléique ( <i>RiboNucleic Acid</i> )
ARNm (mRNA)	Acide RiboNucléique messenger ( <i>messenger RiboNucleic Acid</i> )
ARNmi (miRNA)	micro- ARN (micro- <i>RiboNucleic Acid</i> )
ARNpi (piRNA)	ARN piwi interacting ( <i>piwi interacting RNA</i> )

ARNr (rRNA)	Acide RiboNucléique ribosomal ( <i>ribosomal RiboNucleic Acid</i> )
ARNsi (siRNA)	ARN interférents ( <i>interference RNA</i> )
ARNt (tRNA)	Acide RiboNucléique de transfert ( <i>transfert RiboNucleic Acid</i> )
ARS	Agence Régionale de Santé
ATP	Adénosine TriPhosphate
aw	Activité de l'eau

## B

---

BCAT	<i>branched-chain-amino-acid aminotransferase</i>
BCKD	<i>branched-chain <math>\alpha</math>-ketoacid deshydrogenase</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> / Bouillon cœur-cervelle
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLI	<i>Bio-Layer Interferometry</i>
bPCR	<i>bridge PCR</i> / PCR en pont
BPH	Bonnes Pratiques d'Hygiène
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>

## C

---

CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
CAP	<i>Cold acclimation protein</i>
CC	Complexe Clonal ( <i>Clonal Complex</i> )
CCP	<i>Critical Control Point</i> (point critique)
CDS	<i>Coding DNA sequence</i> (séquence codante de l'ADN)
CE (EC)	Commission Européenne ( <i>European Commission</i> )
Cfa	<i>Cyclopropane Fatty Acid</i>
CL	Cardiolipine
CLHP (HPLC)	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (microscopie confocale laser à balayage)
CNR	Centre National de Référence



CoA	Coenzyme A
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSP	<i>Cold Shock Protein</i>
C <sub>T</sub>	<i>Cycle threshold</i> (Cycle seuil)
Cti	<i>cis trans isomérase</i>

## D

---

DDETSPP	Direction Départementale de l'Emploi, du Travail, des Solidarités et de la Protection des Populations
DDM	Date de Durabilité Minimale
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DGCCRF	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DHA	Acide docosahexaénoïque
DLC	Date Limite de Consommation
DO (OD)	Densité Optique ( <i>Optic Density</i> )

## E

---

Ecad	E-cadhérine
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EPA	Acide eicosapentaénoïque
GLA	Acide $\gamma$ -linolénique
EPS	Extracellular Polymeric Substances Substances polymériques extracellulaires / Exopolysaccharide
Fab	<i>Fatty acid biosynthesis</i>
Fak	<i>Fatty acid kinase</i>
FASII	<i>Fatty Acid Synthesis Type II</i> (Biosynthèse des acides gras)
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads</i>

## G

---

g	gramme
GAD	<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i> / Glutamate décarboxylase

GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)
GN	<i>Gene name</i> (nom de gène)
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i> (analyse de comparaison de génome)

## H

---

HACCP	<i>Hazard Analysis Critical Control Point</i> (analyse des risques et de maîtrise des points critiques)
-------	--

## I

---

ICSP	<i>International Committee of Systematics of Prokaryotes</i> (Comité international de la nomenclature des procaryotes)
IFS	<i>International Food Safety</i>
INCA	Étude individuelle nationale des consommations alimentaires
Inl	Internaline
INRAE	Institut National de la Recherche Agronomique et Environnementale
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organisation internationale de normalisation)
kb	Kilobase
KIC	$\alpha$ -keto-isocaproate
KIV	$\alpha$ -keto-isovalerate
KMV	$\alpha$ -keto-méthylvalerate

## L

---

LIPI	<i>Listeria Pathogenicity Island</i> (îlot de pathogénicité)
LLO	Listériolysine O
LNR	Laboratoire National de Référence
Lyso-PA	Acide Lyso-Phosphatidique

## M

---

M	Valeur de stabilité du gène
m	mètre
MCP	<i>Methyl aCcepting Protein</i> (protéine acceptrice de méthyl)
MET (TEM)	Miscroscope Électronique en Transmission ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
min	minute
mL	milliLitre
MLST	<i>MultiLocus Sequencing Typing</i>
mm	millimètre

## N

---

N <sub>0</sub>	Contamination bactérienne initiale
NA	<i>Not Applicable</i>
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADHP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ND	Non Déterminé
N <sub>f</sub>	Concentration bactérienne finale
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Séquençage de nouvelle génération)
nm	nanomètre
ns	non significatif

## P

---

PA	Acide Phosphatidique
PALCAM	<i>Polymixin Acriflavine Licl Ceftazidime Aesculin Mannitol</i>
PAM (RTE)	Prêt-À-Manger ( <i>Ready-To-Eat</i> )
pb (bp)	paire de bases ( <i>base pair</i> )
PC	Plan de Contrôle
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Réaction en chaîne par polymérase
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PG	PhosphatidylGlycérol

Plc	Phospholipase
PMS	Plan de Maîtrise Sanitaire
PNNS	Programme National de Nutrition Santé
PO <sub>4</sub>	Phosphate
PrfA	Positive regulatory factor A / Régulateur positive
Prokka	<i>rapid prokaryotic genome annotation</i>
PS	Plan de Surveillance

## Q

---

qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
------	--

## R

---

RASFF	Réseau d'Alerte Rapide Européen
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIN	<i>RIN Integrity Number</i> / Score d'intégrité de l'ARN
RNA-Seq	<i>RNA Sequencing</i> / Séquençage de l'ARN
RPKM	Reads Per Kilobase per Million mapped reads
rpm	Rotation Per Minute / Rotation par minute
RT-qPCR	Reverse Transcriptase quantitative PCR Transcription inverse avec PCR quantitative

## S

---

s	seconde
SBS	Sequencing By Synthesis / Séquençage par synthèse
SCFA	<i>Short Chain Fatty Acid</i> (Acide gras à chaîne courte)
scRNA-Seq	<i>single cell RNA-sequencing</i> Séquençage de l'ARN en cellule unique
SME	<i>sterculic acid methyl ester</i> (ester méthylique de l'acide sterculique)
SNC	Système Nerveux Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPF	Santé Publique France

SSI-1 *Stress Survival Islet* (ilôt de survie aux stress)

ST *Sequence Type*

## T

TCS *Two Component System* (Système à deux composantes)

T<sub>max</sub> Température de croissance maximale

T<sub>min</sub> Température de croissance minimale

T<sub>opt</sub> Température de croissance optimale

TSB *Tryptone Soy Broth* (Bouillon Tryptone Soja)

## U

UFC (CFU) Unité Formatrice de Colonie (*Colony-Forming Unit*)

URF (RFU) Unité Relative de Fluorescence (*Relative Fluorescence Unit*)

## W

WAMT *Weighted Average Melt Temperature*

WGS *Whole Genome Sequencing* / Séquençage du génome entier

## Y

YOPI *Young Old Pregnant Immunocompromised*

## Caractères particuliers

#FA *Exogenous Fatty Acid* (Acide gras exogène)

°C Degré Celsius

ε Efficacité

λ Longueur d'onde

μL microlitre

μm micromètre

μ<sub>max</sub> Taux de croissance maximum

σ<sub>B</sub> Facteur alternatif Sigma B

σ<sub>H</sub> Facteur alternatif Sigma H

σ<sub>L</sub> Facteur alternatif Sigma L

# LISTE DES FIGURES

---

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE – Chapitre 1

---

Figure 1-1. Photographie de <i>Listeria monocytogenes</i> au microscope électronique à balayage (MET) après une culture à 37°C en TSB .....	21
Figure 1-2. Étapes de formation d'un biofilm .....	30
Figure 1-3. Schéma de l'infection de l'hôte humain par <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	39
Figure 1-4. Organisation des îlots de pathogénicité de <i>Listeria</i> . .....	41
Figure 1-5. Régulation des gènes de virulence chez <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	41
Figure 1-6. Dispositif de surveillance des contaminations de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments en France .....	54

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE – Chapitre 2

---

Figure 2-1. Structure de l'enveloppe bactérienne des bactéries à Gram positif (à gauche) et à Gram négatif (à droite).....	57
Figure 2-2. Structure d'un glycérophospholipide .....	60
Figure 2-3. Exemple de différentes structures des acides gras .....	63
Figure 2-4. Biosynthèse des acides gras, FASII.....	65
Figure 2-5. Biosynthèse des acides aminés branchés. ....	67
Figure 2-6. Biosynthèse des lipides membranaires.....	69
Figure 2-7. Notion de la zone de confort. ....	72
Figure 2-8. Mécanismes majeurs de la réponse aux stress environnementaux chez <i>L. monocytogenes</i> .....	73
Figure 2-9. Mécanismes de réponse au stress froid enclenchés par <i>L. monocytogenes</i> .....	74

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE – Chapitre 3

---

Figure 3-1. Système d'incorporation des acides gras exogène chez <i>Escherichia coli</i> ...88	
Figure 3-2. Système d'incorporation des acides gras exogènes chez les bactéries à Gram positif. ....	90

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE – Chapitre 4

---

<b>Figure 4-1.</b> Représentation des principales méthodes « omiques » à l'échelle d'une cellule.....	101
<b>Figure 4-2.</b> Principe du séquençage par la technologie Illumina®.....	103
<b>Figure 4-3.</b> Technologies de détection de l'expression d'un gène cible par PCR quantitative.....	111
<b>Figure 4-4.</b> Représentation schématique d'une courbe d'amplification de PCR quantitative.....	112

## RESULTATS EXPERIMENTAUX - Partie 1 - II.

---

<b>Figure 2-1.</b> Growth rates (A) (n=20) and fatty acid composition expressed in four categories (SFA, i BFA, ai BFA and UFA) (B) (n=5 to 6) of <i>L. monocytogenes</i> when grown in TSB with or without 0.05% BSA.....	141
<b>Figure 2-2.</b> Growth rates (A) (n=8 to 20) and fatty acid composition expressed in four categories (SFA, i BFA, ai BFA and UFA) (B) (n=4 to 10) of <i>L. monocytogenes</i> when grown in TSB supplemented with different concentrations of oleic acid.....	142
<b>Figure 2-3.</b> (A) Growth rates at 5°C (h-1) (n=5 to 20) and (B) fatty acid composition (n=3 to 10) expressed in four categories (SFA, i BFA, ai BFA and UFA) .....	143
<b>Figure 2-4.</b> (A) Weighted average melting temperature (WAMT, n=3 to 10) of the membrane fatty acids of <i>L. monocytogenes</i> at 5°C with #FA supplementation or without (control) and (B) relationship between WAMT and growth rate for #UFA, control and #SFA.....	145

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 2 - I.

---

<b>Figure 1-1.</b> Analyse en Composante Principale (ACP) sur les <i>counts</i> bruts de chaque réplicat biologique. ....	156
<b>Figure 1-2.</b> Évaluation des données de RNA-seq de <i>L. monocytogenes</i> à 5°C et 37°C avec ou sans supplémentation en acide oléique (C18:1).. ....	158
<b>Figure 1-3.</b> Workflow représentant les différentes étapes de travail effectuées dans cette étude pour quantifier l'expression de gènes cible par RT qPCR.....	159
<b>Figure 1-4.</b> Impact de différents traitements en vue de l'élimination de l'ADNg dans les échantillons d'ARN totaux .....	161
<b>Figure 1-5.</b> Profils d'expression des six gènes de référence potentiels chez <i>L. monocytogenes</i> .....	167

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 2 - II.

---

- Figure 2-1.** Hierarchical clustering tree of RNA sequencing biological samples ..... 181
- Figure 2-2.** Global heatmap representation of the relative variations of expression level across 4 pairwise comparisons for differentially expressed genes. .... 183
- Figure S2-1.** Evaluation of RNA sequencing data of *Listeria monocytogenes* Lm208 strain at 5°C and 37°C with or without #C18:1w9 supplementation.. .... 182
- Figure 2-3.** Chemotaxis and flagellar assembly in *L. monocytogenes* and the transcriptome of key genes at 5°C or 37°C with #C18:1 or without.. .... 185
- Figure 2-4.** Fatty acid biosynthesis of *L. monocytogenes* and transcriptome of key genes at 5°C or 37°C with or without #C18:1.. .... 187
- Figure 2-5.** Quantitative RT qPCR analysis of four genes of interest. Relative expression of *pct* (A), *fabK2* (B), *cheY* (C) and *flaA* (D) of *L. monocytogenes* at 5°C with #C14, #C18:1, #C18:2 at time points T1, T2, T3..... 189
- Figure 2-6.** Fatty acid composition expressed in four FA categories (SFA, i BFA, a BFA and UFA) of *L. monocytogenes* at 5°C with #C14, #C18:1, #C18:2 or without (Control) at time points T1, T2, T3..... 190
- Figure 2-7.** (A) TEM images and (B) bacterial cell and flagellar lengths of *L. monocytogenes* grown at 5°C or 37°C with #C18:1, #C18:2, #C14 or without ..... 191

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 2 - III.

---

- Figure 3-1.** Action concertée des systèmes Tat et Fep pour la réduction du fer ferrique en fer ferreux, puis son internalisation dans la cellule bactérienne. .... 197
- Figure 3-2.** Analyse de l'expression des gènes par RT qPCR des gènes (A) *tatA*, (B) *cspB*, (C) *degU* et (D) *ddpE* de *L. monocytogenes* à 5°C avec C14, #C18:1, #C18:2 à trois points de la phase de croissance (T1, T2, T3). .... 200



# LISTE DES TABLEAUX

---

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE – Chapitre 1

---

Tableau 1-1. Les espèces et les sous-espèces du genre <i>Listeria</i> .....	25
Tableau 1-2. Sérotypes du genre <i>Listeria</i> basés sur les antigènes somatiques (O) et flagellaires (H).....	26
Tableau 1-3. Principales épidémies de listériose en France dont plus de 10 cas ont été signalés.....	47
Tableau 1-4. Critères de sécurité des denrées alimentaires pour <i>Listeria monocytogenes</i> , extrait du règlement EC n°2073/2005.....	52

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE – Chapitre 3

---

Tableau 3-1. Composition en acides gras de quelques produits alimentaires d'origine végétale ou animale.....	86
--	----

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE – Chapitre 4

---

Tableau 4-1. Comparaison entre deux méthodes d'exploration du transcriptome : le RNA-sequencing et la RT-qPCR.....	119
--	-----

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 1 - I.

---

Table 1-1. Genome metrics of <i>L. monocytogenes</i> Lm208 and comparison to domestic reference strains EGD e, EGD, ScottA, LO258 and 10403S.....	130
Table 1-2. FASII and fatty acid metabolism related genes.....	132
Table 1-3. Interrupted loci in <i>L. monocytogenes</i> Lm208.....	133

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 1 - II.

---

Table 2-1. Fatty acid composition of <i>L. monocytogenes</i> grown in presence of several #FA (%/total area).....	144
---	-----

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 2 - I.

---

Tableau 1-1. Bilan de l'évaluation <i>in silico</i> et <i>in vitro</i> des couples d'amorces de l'ensemble des gènes.....	165
---	-----

## RESULTATS EXPERIMENTAUX – Partie 2 - II.

---

Table S.2-1. Functional category distribution for each gene expression cluster.....	177
---	-----

Table 2-1. Primers used for quantitative PCR .....	179
--	-----

# INTRODUCTION GENERALE

---

Découverte au début du XX<sup>ème</sup> siècle, *Listeria monocytogenes* est une bactérie d'origine alimentaire responsable de la listériose, pathologie à caractère zoonotique classée cinquième en termes de signalement et une des plus sévères en Europe en 2022 (EFSA and CDC, 2023). De par son taux de létalité élevé (18,1% en Europe en 2022), la listériose pose un véritable problème de santé publique. En raison de son caractère ubiquitaire, *L. monocytogenes* est retrouvée dans le sol, les réseaux hydriques, les végétaux, ainsi que dans les industries agro-alimentaires et donc dans une grande variété de denrées alimentaires. Les produits particulièrement touchés par la présence de la bactérie sont les produits prêt-à-manger (PAM), ou *ready-to-eat* (RTE), tels que les poissons fumés, la charcuterie ou les produits laitiers. Les PAM sont des produits souvent faiblement traités thermiquement et/ou emballés sous atmosphère modifiée afin de préserver les propriétés nutritionnelles et ne pas dénaturer les propriétés organoleptiques. Ces produits peuvent souvent permettre la croissance de *L. monocytogenes*. Dans le but de garantir la sécurité sanitaire de cette catégorie de produit, une réglementation particulière a été mise en place : « absence de la bactérie dans 25 g » en sortie d'usine sur cinq échantillons (n = 5) et « inférieur à 100 UFC/g » (n = 5) en fin de date limite de consommation (DLC) (Règlement EC 2073/2005, Catégorie 1.2) (CE, 2005). La maîtrise du développement de *L. monocytogenes* dans les produits permettant sa croissance se fait par le maintien de la chaîne du froid entre la sortie d'usine et la DLC. Les basses températures permettent une inhibition de la croissance bactérienne ou au moins une baisse importante du taux de croissance quand il s'agit de bactéries psychrotrophes, telles que *L. monocytogenes*. Les basses températures provoquent en effet une rigidification de la membrane bactérienne, limitant les interactions de la bactérie avec son environnement et par conséquent sa croissance. Pour contrer cette rigidification membranaire, toutes les bactéries, y compris *L. monocytogenes*, ajustent la composition de leurs acides membranaires en privilégiant la synthèse d'acides gras apportant plus de fluidité, comme, par exemple, les acides gras branchés de conformation *anteiso*- et/ou les acides gras avec une chaîne acyle plus courte. Des recherches récentes ont également

démontré le rôle des acides gras exogènes dans l'adaptation au froid de *L. monocytogenes*. De plus, comme de nombreuses autres bactéries, *L. monocytogenes* est capable d'incorporer les acides gras présents dans son environnement, ce qui affecte sa composition en acides gras membranaires. Chez *L. monocytogenes*, cette incorporation est accentuée à basse température, et selon la nature de l'acide gras exogène, l'impact sur la croissance diffère : en présence d'acides gras insaturés (AGI), une surcroissance significative du pathogène est observée, alors qu'en présence d'acides gras saturés (AGS), son développement décroît fortement (Touche et al., 2023). Ce phénomène de surcroissance à basse température peut impacter la DLC du produit : une réduction de deux jours est observée lors d'une supplémentation en AGI à 5°C par rapport à la condition témoin (sans AGI) (Touche et al., 2023). Ce phénomène de surcroissance à basse température en présence d'acides gras insaturés a également été démontré chez *Bacillus cereus* (de Sarrau et al., 2013).

Un Programme National de Nutrition Santé (PNNS) a été mis en place en France dans le but d'améliorer l'état de santé général de l'ensemble de la population en agissant notamment sur la nutrition. À ce jour, le PNNS a été reconduit trois fois depuis sa création (dernière reconduction PNNS-4 de 2019 à 2023). Au sein du PNNS, plusieurs groupes de travail ont été mobilisés en vue de travailler sur des diverses thématiques en faisant intervenir différents acteurs (administrations, producteurs, secteurs agro-alimentaires, distributeurs, restauration collective, représentants des consommateurs, instances scientifiques...). L'un de ces groupes de travail, consacré aux lipides dans l'alimentation, avait pour objectif de : (1) diminuer les apports en lipides totaux et notamment les apports en acides gras saturés et en acides gras insaturés de conformation *trans*-, (2) rééquilibrer les apports entre les acides gras insaturés *oméga 6* et *oméga 3*. Ces dernières années, les entreprises agro-alimentaires cherchent à atteindre ces objectifs en reformulant leurs produits transformés (INRAE and Anses, 2013).

D'après les études qui montrent une possible surcroissance de *L. monocytogenes* à basse température en présence d'acides gras insaturés, ces rééquilibrages entre AGS/AGI et entre *oméga 3* / *oméga 6* pourraient favoriser la croissance de la bactérie dans les PAM conservés à basse température. Les produits concernés sont, par exemple, des salades composées contenant des sauces aux huiles végétales.

De plus, l'étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA3) a démontré que les températures des réfrigérateurs domestiques sont au-dessus des températures recommandées (comprises entre 0 et 4°C) avec 20% des ménages ayant des réfrigérateurs avec des températures supérieures à 8°C (Anses, 2023). L'ensemble de ces facteurs peut donc conduire à une augmentation du risque de listériose à la suite de consommation de produits réfrigérés riches en AGI.

Ce travail de thèse vise à identifier les déterminants de l'utilisation des acides gras exogènes par *L. monocytogenes* à basse température afin de comprendre le phénomène de surcroissance lors d'une supplémentation en AGI. Les objectifs de cette thèse sont : d'une part d'étudier la relation entre l'incorporation des acides gras exogènes et la surcroissance de la bactérie à basse température, d'autre part de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'incorporation des acides gras exogènes dans la membrane bactérienne et les conséquences sur la composition membranaire.

Ce manuscrit de thèse est structuré en trois parties :

Dans un premier temps, l'état de l'art, organisé en quatre chapitres : (1) la bactérie *L. monocytogenes*, de ses caractéristiques phénotypiques et génotypiques à son cycle infection chez l'Homme en passant par les moyens de lutte et de prévention, (2) la membrane bactérienne, sa structure, sa composition et sa régulation en particulier lors de stress environnementaux, (3) l'impact des lipides de la matrice alimentaire sur le comportement bactérien, et (4) les outils permettant une analyse

globale et ciblée du transcriptome bactérien.

Dans un second temps, les résultats expérimentaux sont divisés en deux parties : (1) caractérisation de la souche d'intérêt de *L. monocytogenes* : le séquençage de son génome et la caractérisation de son comportement en présence d'acides gras exogènes, et (2) étude du transcriptome global et ciblé de cette souche d'intérêt à basse température et en présence de différents acides gras exogènes.

Enfin, la dernière partie est consacrée à la discussion générale des résultats et à leur mise en perspective.

# ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---



# **CHAPITRE 1**

## ***Listeria monocytogenes***

Isolée pour la première fois dans des lésions hépatiques de lapin en 1911, *Listeria monocytogenes* n'est décrite qu'en 1926 à l'Université de Cambridge lors d'une épidémie touchant les animaux du laboratoire et est, à l'origine, associée au genre indéfini *Bacterium* (Hulphers, 1911; Murray et al., 1926). L'année suivante, l'équipe de Pirie (1927) isole une bactérie à Gram positif au cours d'une infection des gerbilles sauvages en Afrique du Sud et propose le nom de genre *Listerella* en l'honneur à Joseph Lister, pionnier de l'asepsie moderne. Les deux bactéries découvertes présentaient de fortes similitudes et ont été renommées *Listerella monocytogenes*. Néanmoins, le nom de genre *Listerella* désignait déjà d'autres microorganismes, et a été rejeté par le comité en charge de la nomenclature bactérienne (ICSP, *International Committee on Systematic Bacteriology*) (Buchrieser and Rocourt, 2007). Pirie (1940) renomme donc la bactérie connue sous le nom actuel de *L. monocytogenes*.

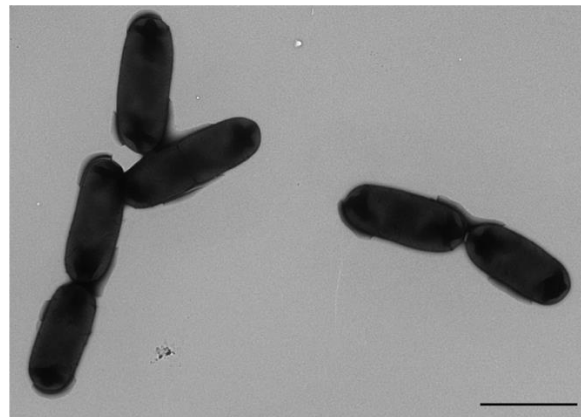
Le caractère pathogène pour l'Homme de la bactérie est reconnu en 1929 au Danemark à la suite d'un isolement de *L. monocytogenes* à partir d'hémoculture de patients atteints d'une infection de type mononucléose (Nyfelt, 1929). Cependant, une bactérie isolée dans le liquide céphalo-rachidien d'un soldat à Paris en 1919 s'est avérée par la suite être *L. monocytogenes* (Cotoni, 1942). Bien que Pirie déclare en 1927 que l'infection se produit par l'alimentation, il faut attendre la fin des années 70 et le début des années 80 pour que le lien entre la contamination des aliments et la listériose, nom donné à la pathologie, soit établi (Pirie, 1927; Schlech et al., 1983). À ce jour, la listériose est la cinquième zoonose la plus fréquemment signalée chez l'Homme en Union Européenne et l'une des maladies d'origine alimentaire posant un véritable problème de santé publique (EFSA, 2023).

## 1.1 Caractéristiques générales et taxonomie

### 1.1.1 Caractéristiques phénotypiques

#### 1.1.1.1 Morphologie

*L. monocytogenes* forme des bacilles courts et réguliers de 0,5 µm de largeur et de 0,5 à 2 µm de longueur, généralement isolés ou en chaînettes (Figure 1-1). Comme toutes les espèces du genre *Listeria*, c'est une bactérie à Gram positif. Elle est micro-aérophile et anaérobie facultative. Les flagelles péritriches (répartis sur l'ensemble de la surface cellulaire) lui permettent d'être mobile lors d'une croissance en dessous de 25°C, mais est immobile à 37°C. Sur un milieu gélosé, *L. monocytogenes* forme des colonies rondes et translucides de 0,5 à 1,5 mm de diamètre après 24 à 48 heures (Liu, 2008; Piveteau, 2017; Anses, 2020).



**Figure 1-1.** Photographie de *Listeria monocytogenes* au microscope électronique à balayage (MET) après une culture à 37°C en TSB (barre d'échelle 2 µm) (zoom x3) (Plateforme Mima2, GABI, INRAE – Aurore Quilleré, Christine Longin).

#### 1.1.1.2 Métabolisme

Les bactéries du genre *Listeria* sont relativement peu exigeantes sur le plan nutritionnel et se développent sur la plupart des milieux non sélectifs, tels que les milieux TSB (bouillon tryptone soja ou *Tryptone Soya Broth*) ou BHI (bouillon cœur-cerveille ou *Brain Heart Infusion*). Après 12 heures d'incubation à 30°C en BHI, la phase stationnaire est habituellement atteinte. *L. monocytogenes* est généralement catalase positif, oxydase négatif. Elle est capable de fermenter de nombreux glucides

sans produire de gaz. La fermentation du glucose en condition aérobie entraîne la formation d'acide acétique, butyrique, *iso*-valérique et lactique, ce dernier étant le seul produit lors d'une diminution de la disponibilité en oxygène (Liu, 2008; Piveteau, 2017). De plus, la bactérie est capable d'hydrolyser l'esculine afin d'obtenir une source de carbone et d'énergie. Cette capacité est utilisée pour la détection de la bactérie, notamment dans le bouillon de Fraser ou dans le milieu gélosé PALCAM® (Fraser and Sperber, 1988; ISO, 2017a ; ISO, 2017b).

### 1.1.1.3 Effet de la température, du pH et de l'activité de l'eau

*L. monocytogenes* peut survivre et se développer dans une large gamme de conditions : température, pH et activité de l'eau ( $a_w$ ). Elle peut se développer dans une gamme de température allant de -2°C à 45°C avec un optimum de croissance entre 30°C et 37°C (Walker et al., 1990; Augustin et al., 2005). De par ses valeurs de températures optimum et minimum, la bactérie est dite psychrotrophe. La bactérie possède la capacité à se multiplier dans une gamme de pH allant de 4,0 de 9,6 avec un optimum à 7 (Walker et al., 1990; Giotis et al., 2008). Enfin, elle se développe lorsque l' $a_w$  est supérieure à 0,92 (Farber and Peterkin, 1991).

En revanche, *L. monocytogenes* est sensible à la chaleur et présente des temps de réduction décimale variant de 1,3 à 16,7 min à 60°C et de 0,06 à 0,2 min à 70°C et des valeurs de « z » comprises entre 4 et 11°C (Bell and Kyriakides, 2012; Anses, 2020). Elle est facilement détruite par la pasteurisation ou par une cuisson bien conduite des aliments (Bell and Kyriakides, 2012).

### 1.1.2 Taxonomie du genre *Listeria*

Les données de séquençage de l'ADN ribosomique 16S (ADNr 16S) situent le genre *Listeria* dans le phylum des Firmicutes, la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Bacillales* et la famille des *Listeriaceae* (Schoch et al., 2020). Ce genre est composé de 27 espèces et 8 sous-espèces divisées en deux clades distincts : *Listeria sensu lato* (18 espèces) et *Listeria sensu strictu* (9 espèces) (Tableau 1-1) (Orsi and Wiedmann, 2016). Ce dernier

regroupe les deux espèces pathogènes, *L. monocytogenes* (Homme et animal) et *Listeria ivanovii* (animal, principalement chez les bovins) (Vázquez-Boland et al., 2001b).

Le premier génome séquencé de *L. monocytogenes* a été publié en 2001 et concerne la souche de référence EGD-e (Glaser et al., 2001). En 2017, 57 génomes complets de *L. monocytogenes* étaient disponibles sur les bases de données et suggèrent que *L. monocytogenes* présente une synténie génomique élevée (conservation de l'ordre des gènes sur le chromosome). À ce jour, plus de 60 000 génomes sont disponibles sur la base de données NCBI, dont 504 sont complets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=1639>, consulté le 25 juillet 2024). Des collections d'isolats de divers environnements sont également disponibles, telles que celles constituées par l'Institut Pasteur, par le consortium européen LISTADAPT ou encore le projet LiSEQ financé par l'EFSA (*European Food Safety Authority*) (Painset et al., 2019; Félix et al., 2022). Le génome de *L. monocytogenes* est un chromosome circulaire d'environ 2,9 millions de paires de base avec un pourcentage G+C est d'environ 39%. Il montre un fort degré de synténie avec les génomes de *Bacillus subtilis* et de *Staphylococcus aureus*, ce qui indique que les génomes de ce groupe de bactéries sont particulièrement stables (Glaser et al., 2001). Les analyses génomiques comparatives des *Listeria* séquencées avant 2013 suggèrent que les gènes et la synténie génomique sont très conservés malgré la diversité des niches écologiques et du potentiel pathogène (den Bakker et al., 2010, 2012, 2013; Chen et al., 2017). Ces analyses ont révélé qu'environ 43% du génome de *L. monocytogenes* est composé de gènes centraux (*core genome* gènes présents chez toutes les souches), les 57% restants étant composés de gènes accessoires (*accessory genome*, gènes présents uniquement chez certaines souches) (Tan et al., 2015).

Néanmoins, *L. monocytogenes* étant une espèce génétiquement hétérogène, la nécessité de méthodes de classification s'est faite ressentir très tôt afin de pouvoir suivre les populations d'un point de vue épidémiologique, évolutif et génétique. Plusieurs méthodes ont été développées pour permettre une classification. Les

méthodes de sous-typage pour *L. monocytogenes* comprennent tout d'abord le sérotypage, l'électrophorèse enzymatique multi-locus et les méthodes basées sur l'ADN telles que l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), le ribotypage, l'analyse du polymorphisme de longueur de restriction par PCR (PCR-RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) et le typage de séquences multi-locus (MLST, *MultiLocus Sequencing Typing*) (Wiedmann, 2002b, 2002a)

**Tableau 1-1.** Les espèces et les sous-espèces du genre *Listeria*

Clade	Espèce	Sous-espèces	Année	Pathogène	Source de l'isolement	Références	
<i>Listeria sensu stricto</i>	<i>L. monocytogenes</i>	--	1940	Oui (H/a)	Rongeurs (Angleterre, Afrique du Sud)	Murray et al., 1926; Pirie, 1940	
	<i>L. innocua</i>	--	1981	Oui (a)	Sol et aliment (Allemagne)	Seeliger, 1981	
	<i>L. welshimeri</i>	--	1983	Non	Sol (USA)	Rocourt & Grimont, 1983	
	<i>L. seeligeri</i>	--	1983	Non	Sol, végétaux, fèces de mouton (Europe)	Rocourt & Grimont, 1983	
	<i>L. ivanovii</i>	subsp. <i>ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>		1984	Oui (a)	Animal (Bulgarie)	Seeliger et al., 1984
	<i>L. marthii</i>	--	2010	Non	Sol, eau stagnante et courante (USA)	Graves et al., 2010	
	<i>L. farberii</i>	--	2021	Non	Sol (USA)	Carlin et al., 2021	
	<i>L. immobilis</i>	--	2021	Non	Sol (USA)	Carlin et al., 2021	
	<i>L. cossartiae</i>	subsp. <i>coarsartiae</i> subsp. <i>cayugensis</i>		2021	Non	Sol (USA)	Carlin et al., 2021
	<i>L. swaminthanii</i>	--	2022	Non	Sol (USA)	Carlin et al., 2022	
<i>Listeria sensu lato</i>	<i>L. grayi</i>	subsp. <i>grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>		1992	Animaux et aliments (Europe, Brésil) Végétation (USA)	Larsen & Seeliger, 1966 Rocourt et al., 1992	
	<i>L. rocourtiae</i>	--	2010	Non	Laitue prédécoupée (Autriche)	Leclercq et al., 2010	
	<i>L. fleischmannii</i>	subsp. <i>fleishmeri</i> subsp. <i>coloradonensis</i>		2013	Fromage et caves affinage (Suisse, Italie) Environnement, élevage (USA)	Bertsch et al., 2013 den Bakker et al., 2013	
	<i>L. weihenstephanensis</i>	--	2013	Non	Végétation (Allemagne)	Lang Halter et al., 2013	
	<i>L. floridensis</i>	--	2014	Non	Eau courante (USA)	den Bakker et al., 2014	
	<i>L. aquatica</i>	--	2014	Non	Eau courante (USA)	den Bakker et al., 2014	
	<i>L. cornellensis</i>	--	2014	Non	Eau (USA)	den Bakker et al., 2014	
	<i>L. riparia</i>	--	2014	Non	Eau courante (USA)	den Bakker et al., 2014	
	<i>L. grandensis</i>	--	2014	Non	Eau (USA)	den Bakker et al., 2014	
	<i>L. booriae</i>	--	2015	Non	Surface usine agro-alimentaire (USA)	Weller et al., 2015	
	<i>L. newyorkensis</i>	--	2015	Non	Surface usine agro-alimentaire (USA, Italie)	Weller et al., 2015	
	<i>L. thailandensis</i>	--	2016	Non	Aliment (Thaïlande)	Leclercq et al., 2016	
	<i>L. costaricensis</i>	--	2018	Non	Système de drainage alimentaire (Costa Rica)	Núñez-Montero et al., 2018	
	<i>L. goaensis</i>	--	2018	Non	Mangrove (Inde)	Dojjad et al., 2018	
	<i>L. kieliensis</i>	--	2018	Non	Eaux usées (Allemagne)	Schardt, 2018	
	<i>L. valentina</i>	--	2020	Non	Abreuvoir et fèces de mouton (Espagne)	Quereda et al., 2020	
	<i>L. portnoyi</i>	--	2021	Non	Sol (USA)	Carlin et al., 2021	
<i>L. rustica</i>	--	2021	Non	Eau d'un ruisseau (USA)	Carlin et al., 2021		
<i>L. ilorinensis</i>	--	2022	Non	Fromage lait de vache (Nigeria)	Raufu et al., 2022		

subsp. subspecie, sous-espèces / H : Homme et a : animal

Le sérotypage est la première méthode développée pour classer les souches de *L. monocytogenes*. Basée sur les antigènes somatiques (O, noté de I à XV) et flagellaires (H, noté de A à D), cette méthode permet de classer *Listeria* sp. en 17 sérotypes (ou sérovars), dont 13 attribués à *L. monocytogenes* : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7 (Tableau 1-2) (Liu, 2006) (Seeliger and Höhne, 1979).

**Tableau 1-2.** Sérotypes du genre *Listeria* basés sur les antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) (adapté de (Liu, 2006)

Sérotype	Antigène O	Antigène H	Espèce bactérienne
1/2a	I, II, (III)	A, B	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i>
1/2b	I, II, (III)	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i>
1/2c	I, II, (III)	B, D	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i>
3a	II, (III), IV	A, B	<i>L. monocytogenes</i>
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i>
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	B, D	<i>L. monocytogenes</i>
4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i>
4b	(III), V, VI	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i>
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i>
4c	(III), V, VII	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i>
4d	(III), (V), VI, VIII	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i>
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i>
5	(III), (V), VI, VIII, X	A, B, C	<i>L. ivanovii</i>
6a	(III), V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C	<i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i>
6b	(III), (V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C	<i>L. innocua</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i>
7	(III), XII, XIII	A, B, C	<i>L. monocytogenes</i>
--	(III), XII, XIV	E	<i>L. grayi</i>

Par la suite, quatre lignées phylogénétiques ont été identifiées par électrophorèse enzymatique multi-locus et analyse de l'ADN (Orsi et al., 2011). Il est intéressant de noter que ces lignées de *L. monocytogenes* semblent correspondre aux sérotypes (Nadon et al., 2001; Roberts et al., 2006). La plupart des isolats de *L. monocytogenes* semblent appartenir aux lignées I et II, qui abritent les sérotypes les plus couramment associés aux cas cliniques humains, notamment les sérotypes 1/2b et 4b (lignée I) et le sérotype 1/2a (lignée II). Les souches de la lignée II sont couramment retrouvées dans les aliments. Répandues dans les environnements agricoles, elles sont souvent isolées dans les cas de listériose animale et dans une moindre mesure dans des cas cliniques sporadiques chez l'homme (Orsi et al., 2011).



Le typage de séquences multi-locus (MLST) permet la classification de *L. monocytogenes* en complexes clonaux (CC, *Clonal Complex*) et en types de séquences (ST, *Sequence Type*), qui sont systématiquement utilisés pour décrire la structure de sa population. Cette nouvelle classification donne une meilleure clarté et permet de répartir les souches de *L. monocytogenes* selon leur biodiversité (degré de virulence, type d'infection, origine) (Maury et al., 2016). La comparaison des génomes de larges collectons isolats cliniques et agroalimentaires a notamment permis de mettre en évidence des divergences en termes de niveau de virulence entre les différents CC (Maury et al., 2016). Ainsi, le CC121 et le CC1 sont respectivement les plus fréquemment retrouvés dans les échantillons cliniques et alimentaires (Maury et al., 2016). Les complexes clonaux CC1, CC2, CC4 et CC6 (lignée I) sont associés à des isolats cliniques tandis que les CC9 et CC121 sont associés à des isolats issus d'aliments. Les clones hypervirulents tels que le CC1, sont fortement associés aux produits laitiers, tandis que les clones hypovirulents, CC9 et CC121, sont majoritairement associés aux produits à base de viande. Les souches de référence EGD-e et LO28 appartiennent au CC9 associé aux aliments, mais très rarement à des maladies humaines, tandis que les souches de référence EGD et 10403S appartiennent au CC7, très rarement isolées des aliments et infectant des patients (Maury et al., 2016, 2019).

L'ensemble de ces données génomiques intégrées à des données cliniques permet de mieux comprendre les voies de transmission de la bactérie, de l'environnement agricole aux denrées alimentaires, et d'améliorer la compréhension de son écologie. Cette approche de génotypage des souches à l'échelle du génome, appliquée universellement, a permis d'étudier la diversité d'isolats provenant de sources et de lieux géographiques divers et de démontrer l'existence d'une circulation internationale des souches. Elle a révélé l'étendue de l'hétérogénéité des caractéristiques génomiques de virulence et de résistance au stress parmi les isolats cliniques et alimentaires. L'Institut Pasteur propose un outil de génotypage rapide à partir d'une séquence génomique disponible en ligne (Moura et al., 2016, 2017).

## 1.2 Habitat et réservoir

Du fait de son caractère ubiquitaire, *L. monocytogenes* est capable de survivre dans une grande diversité d'habitats tels que le sol, l'eau, les aliments, les animaux ou l'Homme (Tableau 1-1).

### 1.2.1 Prévalence dans l'environnement et les matières premières

Les bactéries du genre *Listeria* sont couramment présentes les milieux aquatiques, tels que les eaux de rivière, les eaux usées et les effluents industriels et agricoles, mais rarement isolées de l'eau de mer et des eaux souterraines non polluées (Luppi et al., 1988). De plus, l'étude de Colburn a mis en évidence la présence de 19 souches de *L. monocytogenes* dans une eau douce ou à faible salinité en sortie d'eaux usées (sur 30 espèces de *Listeria* dans 37 échantillons) (Colburn et al., 1990). Enfin, la présence du genre *Listeria* a été montrée dans 108 échantillons dont 61 avec *L. monocytogenes* sur 115 échantillons totaux dans des eaux usées urbaines (MacGowan et al., 1994). L'ensemble de ces études de prévalence suggère que la présence de *L. monocytogenes* dans les eaux est fortement liée à l'activité humaine et animale.

*L. monocytogenes* est aussi détectée dans différents types de sol (Vivant et al., 2013). L'étude de Welshimer est la première rapportant la preuve que le sol est une niche écologique pour *L. monocytogenes* avec une présence de la bactérie dans un tiers des 12 échantillons (Welshimer, 1968). Au début des années 70, Weis et Seelinger ont ensuite mis en évidence que la prévalence de *L. monocytogenes* était de 21,4% dans 746 échantillons de sols collectés (Weis and Seeliger, 1975). Néanmoins, le niveau de contamination y est généralement faible, inférieure à  $10^4$  UFC/g (Locatelli et al., 2013). La capacité de survie des souches de *L. monocytogenes* est associée à des gènes spécifiques et non à leur origine ou à leur position phylogénétique (Sévellec et al., 2022). Les plantes et leur système racinaire constituent également une niche favorable pour la bactérie (Welshimer, 1968). *L. monocytogenes* est capable de se développer au sein des végétaux et peut être retrouvé dans le système racinaire de la plante pouvant

atteindre une population de  $10^6$  à  $10^7$  UFC par plante après une inoculation et est aussi capable de s'établir sous forme de biofilm (Truong et al., 2021).

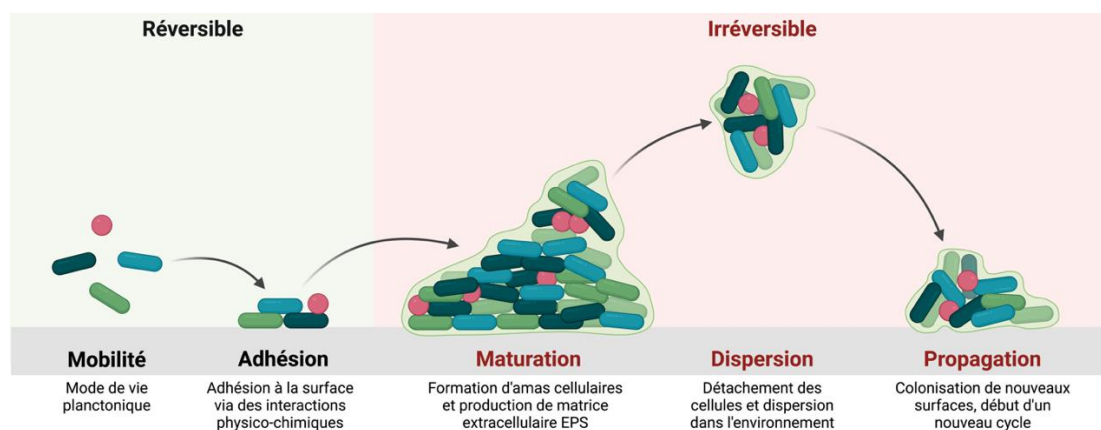
### 1.2.2 Prévalence dans les environnements de production alimentaire

De par sa présence dans les eaux, les sols et les végétaux et ses capacités de croissance, *L. monocytogenes* se retrouve dans les matières premières alimentaires ainsi que dans les usines de transformation des aliments et les zones de distribution. Madden et al. (2018) ont mis en évidence une prévalence de 6,3% de *L. monocytogenes* dans les environnements de transformation de 24 usines, aussi bien dans le secteur carné que laitier. Dans les industries carnées, la prévalence est faible en début de production (15 à 16%), puis augmente au cours de la production pouvant atteindre jusqu'à 84% (Thévenot et al., 2005; Gómez et al., 2015). Les sérotypes 1/2a 1/2b et 1/2c sont les plus fréquemment isolés dans les usines de transformation de la viande, ce qui laisse supposer que ces sérotypes sont les mieux adaptés à ces environnements (Autio et al., 2002; Thévenot et al., 2005). Au sein des zones de distribution, sur 121 établissements distribuant de la viande et des salades, 60% ont été testés positif au moins une fois à la présence de *L. monocytogenes* (Sauders et al., 2009). En effet, la bactérie est retrouvée sur le matériel (trancheuses, ustensiles de cuisine), les surfaces alimentaires (plan de travail, évier) et des surfaces non alimentaires (caisses de transport, chariot) (Sauders et al., 2009). De plus, Wang et al. (2015) ont montré que 12 établissements de distribution sur les 30 présentaient un risque avec une persistance possible de *L. monocytogenes* dans leur environnement.

Dans la nature, les bactéries sont retrouvées sous deux formes, soit une forme planctonique (cellule unique), soit sous forme de biofilm (communautés), mode de vie majoritaire (Flemming et al., 2016). Un biofilm est défini comme « des agrégats de microorganismes dans lesquels les cellules sont fréquemment incorporées dans une matrice autoproduite de substances polymères extracellulaires (EPS) qui adhèrent les unes aux autres et/ou à une surface » (Vert et al., 2012; Flemming et al., 2016). Les biofilms sont présents dans les industries agro-alimentaires (surfaces des équipements,

surfaces des aliments) et sont reconnus comme l'un des principaux facteurs de persistance des microorganismes dans l'environnement (Bridier et al., 2015).

Le principe de formation d'un biofilm peut être résumé en cinq étapes clés : (1) contact initial et adhésion des cellules à l'aide des interactions physico-chimiques (mouvement brownien, forces gravitationnelles ou flux hydrodynamique), (2) adhésion irréversible des cellules avec une répression des gènes impliqués dans la mobilité et une surexpression des gènes impliqués dans l'ancrage et la production de matrice extracellulaire (EPS), (3)/(4) maturation du biofilm dont la taille maximale est atteinte lorsque l'environnement n'est plus favorable à la croissance, et enfin (5) détachement et dispersion des cellules qui peuvent aller coloniser d'autres surfaces (Bridier et al., 2015; Garcia-Gonzalo and Pagán, 2015; Flemming et al., 2016; Rumbaugh and Sauer, 2020; Sauer et al., 2022) (Figure 1-2).



**Figure 1-2.** Étapes de formation d'un biofilm (adapté de Sauer et al. (2022)). Template « Biofilm Formation » de BioRender.com modifié.

Les microorganismes d'un biofilm sont plus tolérants aux stress environnementaux (dessiccation, acidité) et aux agents anti-microbiens (antibiotiques, bactériocines, biocides) grâce, notamment, à la protection de la matrice extracellulaire (Flemming et al., 2016). Les bactéries du genre *Listeria* spp. sont capables de former des biofilms, notamment sur les surfaces alimentaires (Gandhi and Chikindas, 2007; Di Bonaventura et al., 2008). Les biofilms de *L. monocytogenes*, tout comme ceux de nombreux autres pathogènes alimentaires, sont préoccupants car leur résistance aux

traitements de nettoyage et de désinfection rend leur élimination difficile et favorisent leur persistance dans l'environnement (Mah and O'Toole, 2001; Møretrø and Langsrud, 2004; Gandhi and Chikindas, 2007).

## 1.3 *Listeria monocytogenes* dans les aliments

### 1.3.1 Prévalence dans les aliments

Bien que *Listeria* spp. soit rarement isolée dans les fruits de mer récoltés dans des eaux non polluées, elle est souvent présente dans les produits de la mer provenant d'eaux situées à proximité d'une activité humaine. La présence de *L. monocytogenes* dans du saumon, de la truite arc-en-ciel et du lavaret a été mise en évidence, mais aussi chez les bivalves et les mollusques (Eklund et al., 1995; Miettinen et al., 2003; Desdouts et al., 2023).

L'enquête de Luppi a montré la présence de huit souches de *L. monocytogenes* dans des échantillons de viande (sur 13 espèces de *Listeria* dans 113 échantillons) (Luppi et al., 1988). Une forte présence de la bactérie a également été rapportée dans des viandes de volailles (65,6%, 21 échantillons sur 32), de bœufs (34,6%, 9 échantillons sur 26), d'agneaux (40%, 8 échantillons sur 20) et de porcs (28,1%, 9 échantillons sur 32) (MacGowan et al., 1994). Au sein d'une zone de distribution, la présence de la bactérie a également été constatée sur des carcasses de poulet frais. À savoir 95% des carcasses étaient contaminées par des *Listeria*, dont 32% par *L. monocytogenes*, le plus fort pourcentage étant associé à *L. innocua* (66%) (Capita et al., 2001). Autio et al. (2000) ont détecté *L. monocytogenes* jusqu'à 64% dans les viscères de porc, comme la langue, les reins et le foie. En 1992, en France, une épidémie de listériose impliquant 279 patients est survenue à la suite d'une consommation de langues de porc contaminées (Jacquet et al., 1995). *Listeria* spp. a été découverte sur des carcasses d'agneaux (34,8% des carcasses sur 69 échantillons, dont 4,3% *L. monocytogenes*) ainsi que sur des carcasses de lapins et leurs emballages (13,7% sur 51 échantillons, dont 5,4% *L. monocytogenes*) (Jacquet et al., 1995).

La prévalence de *Listeria* spp. dans les échantillons de lait cru est généralement faible. En effet, dans 248 échantillons, seuls 5 échantillons, soit 2,2%, ont révélé la présence de *L. monocytogenes* (Jayarao et al., 2006). Néanmoins, une étude a montré que la source des eaux utilisée pour le lavage des fromages augmente la proportion de la bactérie dans les échantillons (Pak et al., 2002). De plus, une épidémie est survenue au début des années 80 à la suite de la consommation de lait pasteurisé contaminé (Fleming et al., 1985). La contamination des produits peut donc se faire en amont par des contaminations dites croisées.

Les fruits et les légumes constituent aussi un environnement propice au développement de *Listeria* spp. La première épidémie recensée causée par *L. monocytogenes* s'est produite en 1979 à la suite de la consommation de légumes crus comme du céleri, de la salade et des tomates (Ho et al., 1986). En 2014, les fruits à noyaux (nectarines, pêches) ont été impliqués pour la première fois dans une épidémie touchant plusieurs pays. Récemment, une nouvelle épidémie de listériose liée à la consommation de pêches, nectarines et abricots a été rapportée aux États-Unis et à touchée sept états et causée un décès (CDC, 2024).

Enfin, les produits prêt-à-consommer (PAM) sont particulièrement favorables au développement de *L. monocytogenes*. Les PAM sont des aliments destinés au consommateur pour une consommation directe sans qu'il soit nécessaire de les cuire ou de les réchauffer (EFSA, 2018). De plus, dans le but de préserver les qualités nutritionnelles et organoleptiques, ces produits sont faiblement traités thermiquement, ce qui ne permet pas de détruire l'ensemble des pathogènes pouvant être présents (EFSA, 2018). Les produits PAM regroupent une grande diversité de denrées, comme les salades composées, les saumons fumés ou les produits carnés, qui sont le plus souvent conservés à basse température (EFSA, 2018). Étant psychrotrophe, la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas stoppée, mais ralentie. À l'exception des années 2008 et 2009, les produits PAM de la pêche présentaient le niveau de non-conformité le plus élevé (entre 3,5 et 9,6%) (EFSA, 2023). L'enquête de Jofré et de

ses collaborateurs a permis d'avoir une vision globale sur la prévalence et les niveaux de contamination de *L. monocytogenes* dans diverses denrées PAM entre 1990 et 2015 (Jofré et al., 2016). Sur 778 échantillons (n), la bactérie a été retrouvée dans les produits laitiers (n = 276), les produits carnés (n = 173), les fruits de mer (n = 151), les matières premières (n = 104) et les produits frais (n = 74) (Jofré et al., 2016).

En se référant à la classification basée sur les CC élaborée par Maury et al. (2016), les clones plus communément retrouvés dans les matrices alimentaires ne correspondent pas à ceux majoritairement détectés en milieu clinique. Les clones CC9 et CC121 sont fortement associés à une origine alimentaire et sont capables de persister en industrie, alors que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 ont une origine clinique (Maury et al., 2016).

### 1.3.2 Comportement dans les matrices alimentaires complexes

Les systèmes alimentaires sont des systèmes complexes offrant une grande diversité de micro-architectures. Il existe des systèmes liquides aqueux avec ou sans épaississant (soupe ou jus de fruits), des gels aqueux comme le pâté, des émulsions huile dans l'eau, telles que la sauce vinaigrette ou la mayonnaise, des émulsions eau dans l'huile, comme le beurre, ou enfin des émulsions gélifiées, telles que des saucisses ou des fromages (Wilson et al., 2002). Ces systèmes présentent des hétérogénéités au niveau macroscopique (particules solides, fibres et poches d'air) et/ou au niveau microscopique (micro-gouttelettes de graisse ou d'air) (Verheyen and Van Impe, 2021). Les produits alimentaires fournissent des nutriments comme les protéines, les glucides et les vitamines qui peuvent également être distribués de manière hétérogène.

Le niveau de structuration de la matrice affecte la capacité des bactéries à se déplacer dans la matrice (Wimpenny et al., 1995; Skandamis and Jeanson, 2015). Les systèmes liquides permettent aux microorganismes de se déplacer librement, mais, en présence d'épaississants par exemple, la croissance bactérienne peut passer de l'état planctonique à l'état immobilisé. Dans une émulsion de type huile dans l'eau, la

croissance microbienne, qui se produit dans la phase aqueuse, est structurée en fonction de la concentration en matières grasses. Quand le taux de matières grasses est faible (par exemple, inférieur à 30%), *L. monocytogenes* se développe sous forme planctonique dans l'espace libre entre les gouttelettes (Wilson et al., 2002; Baka et al., 2017). À l'inverse, si la proportion d'huile augmente à 83%, *L. monocytogenes* forme des micro-colonies dans l'espace aqueux contraint (Parker et al., 1995). De plus, la taille et la forme des colonies peuvent varier, passant d'une forme diffuse à une forme serrée en fonction du niveau de contraintes structurelles (Saint Martin et al., 2022). La croissance sous forme de colonies peut modifier les conditions physico-chimiques du micro-environnement qui, par cause à effet, modifient la croissance (Wimpenny et al., 1995). Dans ces matrices structurées, la croissance peut être modifiée. Par exemple, l'augmentation du taux de gélatine dans un milieu fait chuter le taux de croissance de *L. monocytogenes* (Aspidou et al., 2014). L'effet de structuration est parfois plus marqué lorsque le pH ou l' $a_w$  du milieu sont faibles. Pour *L. monocytogenes*, les valeurs minimales permettant la croissance planctonique ou immobilisée sur gélose sont respectivement de 4,45 et 5,10 pour le pH et 0,900 et 0,945 pour l' $a_w$  (Koutsoumanis et al., 2004). Il est cependant difficile d'évaluer correctement l'effet de la structuration des aliments sur la croissance, car l'ajout d'agents gélifiants ou de matières grasses peut modifier certains paramètres physico-chimiques du milieu ( $a_w$ , pH). Idem lorsqu'une émulsion gélifiée est spécifiquement conçue pour mimer une viande en conserve, le taux de croissance de *L. monocytogenes* est significativement plus élevé dans la viande, probablement en raison d'un apport différent en protéines (Baka et al., 2016). La présence d'une émulsion peut aussi parfois diminuer fortement, voire annuler, l'efficacité antimicrobienne de certains conservateurs hydrophobes, comme l'eugénol. En effet, ces composés ayant une forte affinité avec la phase lipidique y migrent partiellement (ou majoritairement) et ne sont plus disponibles dans la phase aqueuse en quantité suffisante pour y exercer leur action antimicrobienne (Pernin et al., 2019).



Enfin, au-delà des aspects quantitatifs sur les paramètres de croissance, il est également à noter que la croissance en milieu hétérogène peut entraîner des erreurs dans l'estimation par échantillonnage de la contamination microbienne (cf. Chapitre 1 – 1.5.3). En effet, un aliment hétérogène peut contenir des portions pratiquement stériles et d'autres fortement contaminées (Jongenburger et al., 2012).

## 1.4 La listériose

La listériose est une zoonose pouvant se présenter sous deux formes : non invasive et invasive (Liu, 2008). La forme non invasive se caractérise principalement par des gastro-entérites sans complication et touche généralement une population en bonne santé ayant consommé des denrées alimentaires contaminées (AFSSA, 2000). En revanche, la forme invasive est une forme grave présente sous trois formes cliniques : (1) les listérioses associées à la grossesse et néonatales, (2) les listérioses causant des bactériémies ou des sepsis, (3) les listérioses causant des méningites et des méningo-encéphalites (neuro-listériose). La seconde forme représente 52% des cas de listériose invasive chez l'Homme (CDC, 2013; Charlier et al., 2017). D'autres formes d'infections moins courantes (moins de 1% des cas signalés) ont été identifiées, telles que des infections de la cavité péritonéale, des poumons et de la cavité pleurale, du système cardiovasculaire, des voies urinaires ou biliaires et de l'œil (Bajor et al., 2016; Charlier et al., 2017). Enfin, une forme cutanée correspondant à une éruption pyogranulomateuse a été observée chez les agriculteurs ou les vétérinaires à la suite d'une mise-bas d'un animal d'élevage (exposition à du placenta ou fœtus infectés) (McLauchlin and Low, 1994).

### 1.4.1 Pathogénicité chez l'animal

Les espèces pathogènes chez les animaux sont *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* (Spickler, 2019). Au sein des bâtiments d'élevage, *L. monocytogenes* est isolée sur les mangeoires, les abreuvoirs et/ou les litières (Mohammed et al., 2009; Walland et al., 2015). Bien que de nombreuses espèces animales soient sensibles à la listériose, une grande proportion des animaux sont des porteurs asymptomatiques de *Listeria* spp. et

excrètent la bactérie dans leurs fèces (Esteban et al., 2009; Stein et al., 2018). Ainsi, le bétail peut être contaminé par contact avec un fumier contaminé et par le ruissellement des eaux sur les cultures et donc l'alimentation (Schoder et al., 2022). La présence d'un animal contaminé au sein d'un élevage contribue au maintien de la bactérie dans l'environnement (Schoder et al., 2022). La bactérie est isolée dans l'ensemble du contenu intestinal, les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie, les reins, le cœur et les amygdales des animaux. Ces dernières sont le foyer le plus important chez le porc (Hellström et al., 2010). Dans la filière porcine, la listériose se manifeste principalement par des sepsis ou des diarrhées hémorragiques qui engendrent des symptômes d'anorexie (Ryser and Marth, 2007; Stein et al., 2018). Chez les ruminants (bovins, ovins, caprins), les avortements sont la manifestation la plus courante de la pathologie (Ryser and Marth, 2007). D'autres symptômes peuvent y être associés, tels qu'une anorexie, une somnolence (ou au contraire une excitation anormale), une inflammation mammaire (mammite), une gastro-entérite ou des spasmes musculaires (Spickler, 2019). Dans la filière avicole, la listériose se manifeste par des sepsis, des lésions cardiaques ou, dans les cas aigus, par une congestion et/ou une hémorragie des viscères (Ryser and Marth, 2007). La contamination est très probablement due à un picorage du sol, des fèces ou par la présence de carcasses contaminées par *Listeria* spp. (Ryser and Marth, 2007).

## 1.4.2 Pathogénicité chez l'Homme

### 1.4.2.1 Population à risque

La sensibilité des populations à la listériose dépend considérablement du système immunitaire de l'hôte (Koopmans et al., 2023). La listériose peut se manifester chez des patients jeunes et en bonne santé, mais la forme invasive touche principalement des groupes de population avec un risque bien connu : les femmes enceintes, les nouveau-nés, les personnes âgées et les personnes immunodéprimés. (Armstrong and Fung, 1993; Mylonakis et al., 1998; AFSSA, 2000; Charlier et al., 2017). Les personnes à risques sont désignées par le terme « YOPI » pour *Young, Old,*

### *Pregnant, Immunocompromised.*

L'incidence de la listériose néonatale se situe entre 1,3 et 25 pour 100 000 naissances vivantes (Jackson et al., 2010; Koopmans et al., 2023). L'étude MONALISA a montré que sur seulement 10 nouveau-nés sur 82 ne présentent aucun signe d'infection et 4 décèdent de lésions neurologiques causées par *L. monocytogenes* ou de prématurité (Charlier et al., 2017). Dans les années 90, aux États-Unis, *L. monocytogenes* était la seconde cause de méningite bactérienne chez des nouveau-nés âgés de moins d'un mois. À ce jour, cette tendance semble avoir diminué (Schuchat et al., 1997; Gaschignard et al., 2011; Okike et al., 2014; Ouchenir et al., 2017).

L'incidence de la listériose chez les femmes enceintes est entre 3 à 12 pour 100 000, soit un risque de 10 à 18 fois plus important par rapport à la population globale (CDC, 2013). Ceci est dû à une réponse immunitaire modérée par des niveaux élevés de progestérones (Leber et al., 2011). De plus, certaines minorités ethniques présentent un risque plus élevé, probablement lié aux modes de vie et aux habitudes alimentaires (Koopmans et al., 2023).

L'incidence chez les personnes âgées de plus de 65 ans est de 1,3 cas pour 100 000 habitants (CDC, 2013). Ces personnes ont une réponse immunitaire réduite causée par des altérations fonctionnelles et structurelles des mécanismes de défense se caractérisant par un déficit en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Koopmans et al., 2023). Les infections à *L. monocytogenes* augmentent avec l'âge et sont particulièrement rapportées chez les plus de 84 ans (Quereda et al., 2021).

Les personnes immunodéprimées (maladie génétique, chimiothérapie, traitement) sont plus sensibles aux infections comme la listériose (Koopmans et al., 2023). Les patients atteints d'un cancer semblent être plus susceptibles de développer une neuro-listériose par rapport à des patients en bonne santé (21% contre 5%) (Costerus et al., 2016). Les personnes avec des antécédents de traitement

immunosuppresseur ont 8 fois plus de risque d'avoir une infection cérébrale causée par *L. monocytogenes* par rapport à des personnes n'ayant jamais pris de traitement (Lim et al., 2017). Enfin, bien que la listériose soit rarement signalée comme maladie nosocomiale, les patients hospitalisés peuvent être considérés comme des personnes à risque (Quereda et al., 2021).

#### 1.4.2.2 Exposition, dose infectieuse et incubation

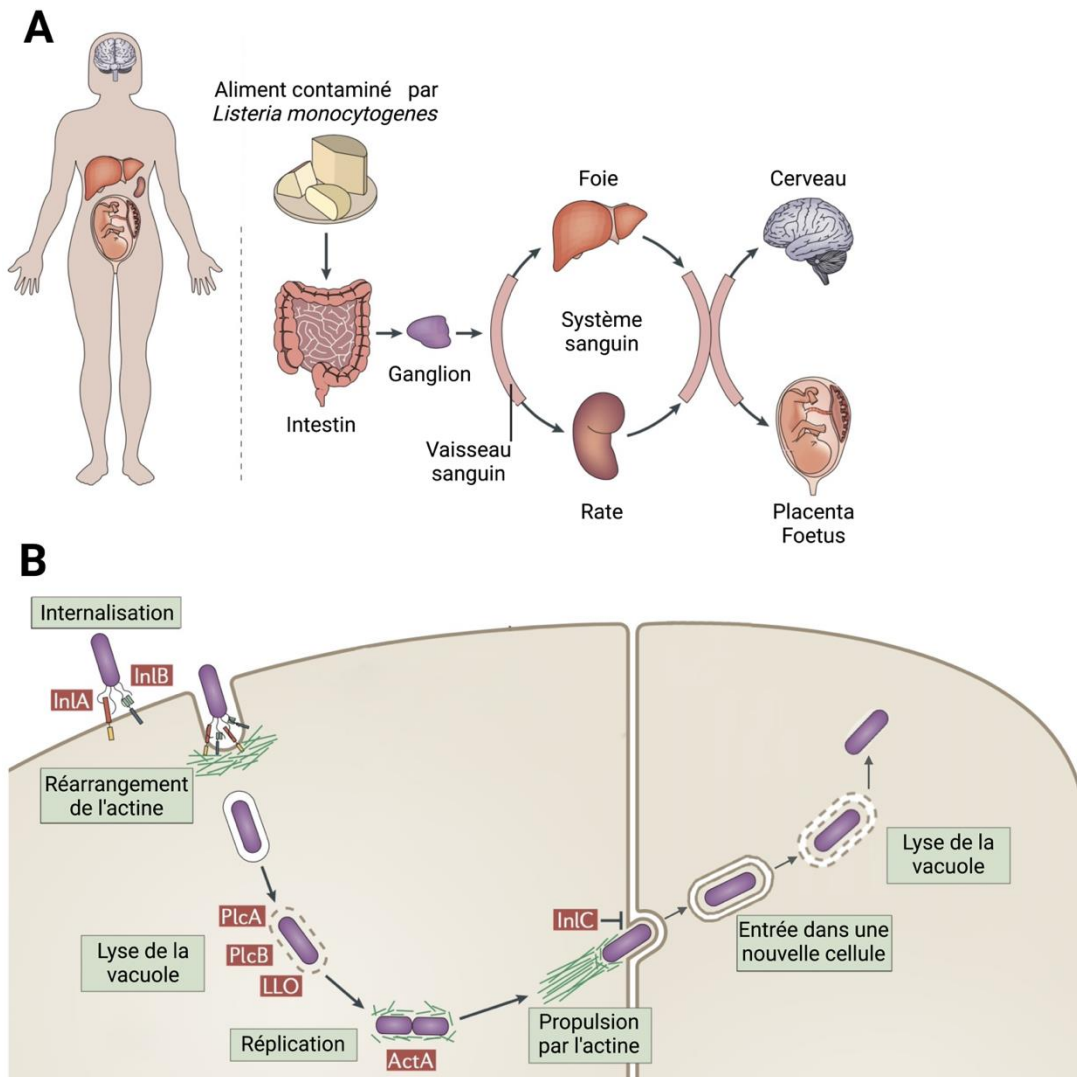
La principale source de contamination chez l'Homme est l'ingestion de denrées alimentaires préalablement contaminés par *L. monocytogenes* (Anses, 2020). Une transmission directe par la peau est possible, en particulier chez les agriculteurs et les vétérinaires (Liu, 2008).

Au cours d'une année, chaque personne serait exposée à *L. monocytogenes* à plusieurs reprises, particulièrement dans les pays occidentaux (Hafner et al., 2021). Néanmoins, la forme invasive de l'infection est très peu fréquente avec une incidence moyenne de 0,6 pour 100 000 habitants en Europe (Hafner et al., 2021). Par définition, la dose infectieuse correspond à la quantité minimale de microorganismes nécessaire pour déclencher une infection chez l'hôte. La dose infectieuse à l'origine des cas de listériose n'est pas encore déterminée, car celle-ci dépend de l'état du système immunitaire de l'hôte et de la virulence de la souche. Quereda et al. (2020) estiment que la dose infectieuse pour une personne à risque serait entre  $10^5$  et  $10^7$  bactéries, alors que chez une personne en bonne santé et non à risque, elle serait entre  $10^7$  et  $10^9$  bactéries. En Europe, il a été rapporté que des doses supérieures à  $10^5$  UFC pour 50 g de produit étaient suffisantes pour causer des listérioses invasives (EFSA., 2018).

La durée d'incubation de la forme non invasive de la listériose serait en moyenne de 24 heures après ingestion. Cependant, la durée d'incubation de la forme invasive est respectivement de 2, 9 voir 28 jours pour la bactériémie, la neuro-listériose et la listériose liée à la grossesse. (Koopmans et al., 2023).

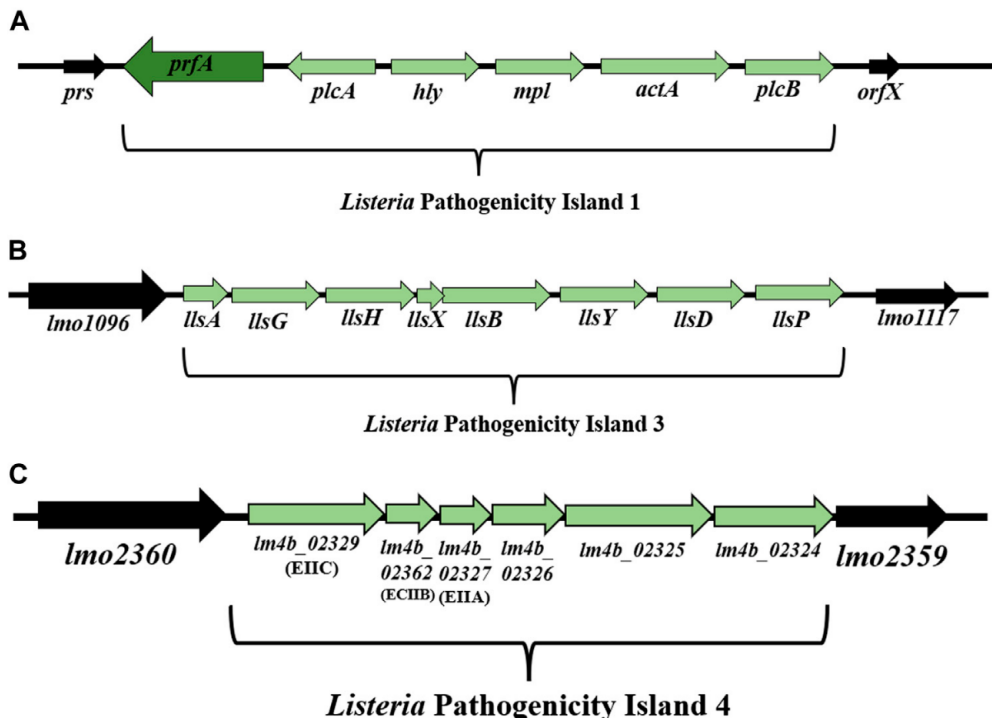
### 1.4.2.3 Mécanisme d'infection chez l'Homme

D'après les données expérimentales et les observations cliniques, le cycle d'infection de *L. monocytogenes* peut se diviser en trois étapes : (1) la survie dans le tractus gastro-intestinal, (2) le passage de la voie intestinale, et (3) la dissémination dans l'organisme (Figure 1-3.A).

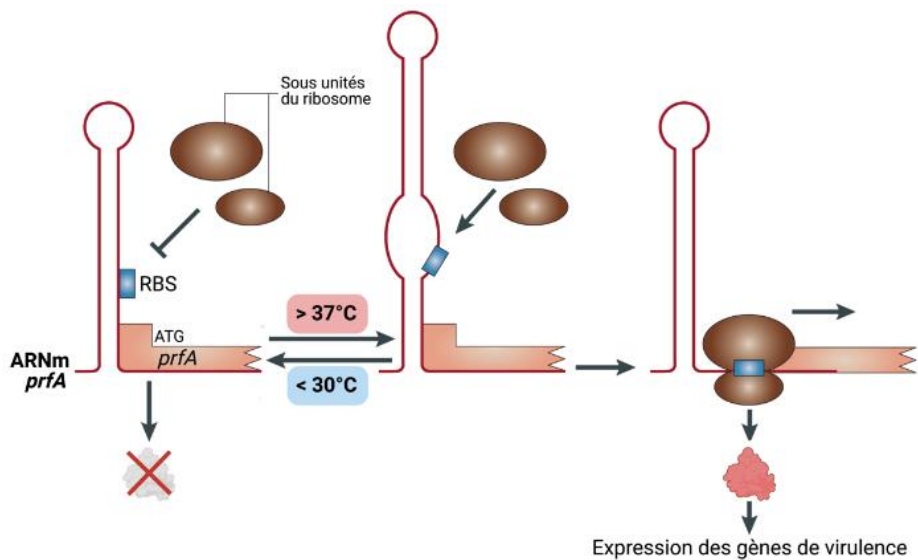


**Figure 1-3.** Schéma de l'infection de l'hôte humain par *Listeria monocytogenes*. (A) Après l'ingestion d'un aliment contaminé, *L. monocytogenes* peut traverser la barrière intestinale et se répandre dans la circulation sanguine. La bactérie peut traverser la barrière hémato-encéphalique ou la barrière foeto-placentaire et provoquer une méningite potentiellement mortelle, une septicémie, une naissance prématurée ou un avortement. (B) À l'échelle intracellulaire, *L. monocytogenes* pénètre dans les cellules par un mécanisme de type zipper. Une fois internalisée, la bactérie peut s'échapper de sa vacuole, se multiplier et se propager à d'autres cellules de l'hôte. Pour mettre en œuvre l'infection, *L. monocytogenes* mobilise ses différents facteurs de virulence : la listériolysine O (LLO), les phospholipases A et B (PlcA et PlcB) et la protéine liant l'actine (ActA). D'après Radoshevich & Cossart (2018), modifié avec BioRender.com

Les principaux gènes de virulence impliqués dans le cycle infectieux intracellulaire de la bactérie sont localisés dans le LIPI-1 (*Listeria Pathogenicity Island 1*) et le locus *inlA-inlB*. L'îlot de pathogénicité LIPI-1 regroupe les gènes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* et *plcB* dans un cluster de 9 kb (Vázquez-Boland et al., 2001b) (Figure 1-4.A). La bactérie reconnaît les récepteurs cellulaires de la cellule hôte grâce à ses protéines de surface InlA et InlB. La cellule est ensuite internalisée par un mécanisme de *zipper* et se retrouve dans une vacuole. Les deux phospholipases PlcA et PlcB agissent conjointement avec la listériolysine O (LLO) codée par *hly* pour lyser la vacuole et permettre à la bactérie de se retrouver dans le cytoplasme (échappement vacuolaire). Une activation préalable de PlcB par la métallo-protéinase codée par *mpl* est nécessaire (Bitar et al., 2008). Enfin, le gène *actA* code une protéine induisant l'assemblage des filaments d'actine afin de permettre la propulsion de la bactérie de cellule en cellule (Figure 1-3.B). Ces gènes sont régulés par l'activateur transcriptionnel PrfA (*positive regulatory factor A*) dépendant de la température (Johansson et al., 2002). En dessous de 30°C (température non permissive), l'ARNm forme une structure secondaire empêchant l'accès du ribosome et donc la traduction de PrfA. Au contraire, à 37°C (température permissive), une boucle apparaît dans cette structure secondaire permettant de libérer les sites de fixation du ribosome et donc la traduction de la protéine correspondante. (Hamon et al., 2006; Toledo-Arana et al., 2009) (Figure 1-5).



**Figure 1-4.** Organisation des îlots de pathogénicité de *Listeria*. (A) Organisation de l'îlot de pathogénicité 1 (LIPI-1) (d'après Vázquez-Boland, Domínguez-Bernal, et al. (2001); Vázquez-Boland, Kuhn, et al. (2001)). (B) Organisation de LIPI-3 parmi les souches de *L. monocytogenes* (d'après : Cotter et al., (2008)). (C) Organisation de LIPI-4 parmi les souches de *L. monocytogenes* (d'après : Maury et al., 2016). Le sens de la transcription est indiqué par les flèches respectives. D'après Wiktorczyk-Kapischke et al. (2023)



**Figure 1-5.** Régulation des gènes de virulence chez *Listeria monocytogenes*. À basse température (<30°C), une structure secondaire se forme dans la région non traduite de l'ARNm de *prfA* bloquant ainsi l'accès au site de liaison du ribosome (RBS). Au-delà de 37°C, une boucle se forme dans la structure secondaire et permet la fixation du ribosome sur le RBS et donc la traduction de PrfA. Une fois produit, PrfA peut aller se fixer sur les promoteurs des gènes de son régulon et activer leur expression. D'après Liu (2008) et Hamon et al. (2006), modifié avec BioRender.com.

D'autres îlots de pathogénicité ont également été décrits grâce notamment aux travaux sur le typage génétique de large collection d'isolats cliniques (Maury et al., 2016; Disson et al., 2021) (Figure 1-4.B et 1-4.C). Le LIPI-2 est une région de 22kb spécifique de l'espèce *L. ivanovii* codant principalement des internalines (Figure 1-4.B) (Guillet et al., 2010). Le LIPI-3 est majoritairement présent dans le génome des souches hypervirulentes du CC1 et CC6 et comprend huit gènes de listériolysine : *lisa*, *lisG*, *lisH*, *lisX*, *lisB*, *lisY*, *lisD* et *lisP* (Figure 1-4.C) (Disson et al., 2021). Cet opéron code la listériolysine S, un peptide qui, après maturation post-traductionnelle, présente des propriétés de bactériocines et de facteur hémolytique et cytotoxique (Cotter et al., 2008; Quereda et al., 2016). La présence du LIPI-4 est majoritairement associée à des souches isolées d'infection du système nerveux central (SNC) ou des infections placentaires et à des souches d'origine asiatique du CC87 (Maury et al., 2016). Ce cluster de 6 kb code une famille de phosphotransférase et détermine le tropisme de *L. monocytogenes* pour le SNC et les cellules du placenta (Maury et al., 2016; Disson et al., 2021) (Figure 1-4.C).

#### 1.4.2.3.1 *Survie dans le tractus gastro-intestinal et îlot de pathogénicité*

Lorsque l'hôte ingère une denrée alimentaire contaminée, *L. monocytogenes* doit dans un premier temps faire face aux stress imposés par le tractus gastro-intestinal (Koopmans et al., 2023). L'estomac est un environnement acide avec un pH compris entre 1,5 et 3,5 (Campbell et al., 2012). *L. monocytogenes* survit à l'acidité gastrique à l'aide de deux systèmes qui permettent la remontée du pH intracellulaire : le système GAD pour *Glutamic Acid Decarboxylase* et le système ADI pour *arginine deiminase* (Quereda et al., 2021). Les gènes *gadD* et *gadT* forment avec trois autres gènes (*mo0444*, *lmo0464* et *pva (lmo0446)*) l'îlot de survie au stress (*Stress Survival Islet*, SSI-1). Ce cluster de 8,7 kb regroupe les gènes associés à la tolérance au stress acide, osmotique et biliaire dans l'estomac, également importants pour l'adaptation et la survie dans l'environnement de transformation des aliments (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023).



Une fois l'intestin atteint, *L. monocytogenes* doit survivre à un stress osmotique et à la bile tout en se retrouvant en compétition avec la flore intestinale de l'hôte (Quereda et al., 2021). Tout d'abord, pour s'adapter au stress osmotique, la bactérie augmente l'absorption de solutés compatibles, tels que la glycine bêtaïne et la carnitine, à l'aide des transporteurs membranaires BetL, Gbu et OpuC (Bayles and Wilkinson, 2000). Ces transporteurs intervenant également en réponse à un stress froid, leur mécanisme est détaillé dans le chapitre suivant (cf. Chapitre 2). Ensuite, pour contrer les effets toxiques de la bile, *L. monocytogenes* hydrolyse les sels biliaires par l'action de l'enzyme BsH et/ou exclure la bile par l'action du transporteur membranaire BilE (Begley et al., 2005; Sleator et al., 2005). Enfin, *L. monocytogenes* doit surmonter la compétition du microbiote intestinal (Koopmans et al., 2023). Un des mécanismes impliqué est la production de bactériocines telle que la listériolysine S, dont il a été montré que la présence avait réduit *in vitro* les bactéries du genre *Allobaculum* et *Alloprevotella* (diminution significative de 3 log et 1 log, respectivement) (Quereda et al., 2016). Le gène *Imo2776* chez *L. monocytogenes* EGD-e produit une bactériocine de type lactococcine, efficace *in vitro* et *in vivo* sur le genre bactérien *Prevotella* (Rolhion et al., 2019).

#### 1.4.2.3.2 Passage de la barrière intestinale

Une fois dans l'intestin, *L. monocytogenes* peut emprunter trois voies pour franchir la barrière intestinale : (1) par l'invasion des cellules caliciformes ou des entérocytes, (2) par une translocation paracellulaire, (3) par les cellules M (Quereda et al., 2021). L'invasion par les entérocytes reste la voie principale. La bactérie utilise un mécanisme de type « fermeture éclair » ou « zipper » (Ribet and Cossart, 2015). Cette voie nécessite l'interaction entre l'internaline A (InIA), protéine ancrée dans la paroi cellulaire bactérienne, et la E-cadhérine, protéine réceptrice de la cellule eucaryote (Quereda et al., 2020). Cette interaction déclenche une cascade de signaux intracellulaires dans la cellule hôte semblable à la signalisation induite lors d'une interaction entre deux E-cadhérines, et permet donc un réarrangement du réseau d'actine. Cette polymérisation d'actine renforce le contact bactérie-cellule hôte et

entraîne une internalisation de *L. monocytogenes* dans la cellule hôte (Hamon et al., 2006; Ribet and Cossart, 2015).

Après internalisation dans les cellules de l'hôte, *L. monocytogenes* se trouve dans une vacuole. Afin de s'échapper de cette enveloppe, *L. monocytogenes* utilise la listériolysine O (LLO) et les deux phospholipases (PlcA et PlcB) (Radoshevich and Cossart, 2018). Une fois la vacuole lysée, la bactérie peut se répliquer dans le cytoplasme de la cellule hôte en utilisant les ressources énergétiques disponibles (Radoshevich and Cossart, 2018). À l'aide de la protéine ActA, *L. monocytogenes* est capable de se déplacer de cellule en cellule à l'aide de la polymérisation d'un filament d'actine lui servant de propulseur (Quereda et al., 2021). Lors du passage dans la cellule voisine, la bactérie se trouve une nouvelle fois dans une vacuole secondaire à double membrane (Radoshevich and Cossart, 2018). Le cycle intracellulaire peut alors recommencer dans la nouvelle cellule hôte (Figure 1-3.B).

#### 1.4.2.3.3 Dissémination dans l'organisme

Après avoir traversé la barrière intestinale, *L. monocytogenes* se propage dans l'organisme par la circulation lymphatique et sanguine jusqu'à atteindre le foie et la rate (Quereda et al., 2021). 90% des bactéries s'accumulent dans le foie, mais sont vite éliminées par les cellules phagocytaires de ce dernier (Ebe et al., 1999). L'élimination de 60% des cellules de *L. monocytogenes* s'effectue dans les 10 minutes après une injection de la bactérie par voie intraveineuse chez des souris (Gregory et al., 1996). Au niveau de la rate, le recrutement des lymphocytes T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> par les cellules dendritiques permet une destruction des cellules infectées par la bactérie (Qiu et al., 2018). Néanmoins, *L. monocytogenes* est capable de s'implanter dans les cellules dendritiques, lui permettant ainsi d'échapper au système immunitaire et persister dans l'organisme de l'hôte (Quereda et al., 2021).

À ce jour, de nombreux aspects de l'invasion du SNC par *L. monocytogenes* sont encore mal compris (Koopmans et al., 2023). *L. monocytogenes* est la seule espèce du genre qui entraîne une infection du SNC, aussi bien chez l'Homme que chez les

ruminants domestiques (Quereda et al., 2021). Plusieurs hypothèses sont évoquées : d'une part, la bactérie pourrait circuler en utilisant les nerfs crâniens préalablement infectés au niveau de la cavité oropharyngé ; d'autre part, la neuro-listériose, en particulier la neuro-listériose natale, pourrait se produire au moment de la naissance par l'intermédiaire de l'épithélium olfactif lorsque le nouveau-né entre en contact avec les cellules vaginales (Pägelow et al., 2018; Quereda et al., 2021). Chez l'Homme, *L. monocytogenes* pourrait être transmise avec le sang et traverser la barrière hémato-encéphalique (Quereda et al., 2021). Certains gènes de virulence codés par quelques souches de *L. monocytogenes*, comme *inlF*, semblent nécessaires pour une colonisation optimale du cerveau (Ghosh et al., 2018).

Chez les femmes enceintes, la listériose est un problème de santé majeur. Charlier et ses collaborateurs ont souligné que plus de 83% des cas de listériose chez les femmes enceintes ont des conséquences néfastes sur le fœtus (naissance prématurée ou décès) (Charlier et al., 2017). *L. monocytogenes* traverse la barrière placentaire et infecte le fœtus par deux voies, soit par une propagation de la bactérie de cellule en cellule, soit par une infection des trophoblastes par les bactéries circulant dans le sang (Vázquez-Boland et al., 2017). Les protéines InlA, InlB et ActA ont un rôle important dans le processus d'invasion de ces cellules (Radoshevich and Cossart, 2018).

#### 1.4.2.4 Traitement de la listériose

Le diagnostic de la pathologie se fait par l'isolement et l'identification de *L. monocytogenes* dans divers échantillons biologiques, tels que le sang, le liquide céphalo-rachidien ou le liquide amniotique (Koopmans et al., 2023).

Une fois la pathologie diagnostiquée, l'administration d'un traitement est primordiale pour prévenir les complications (séquelles à long terme, décès) (Quereda et al., 2021). Le traitement se fait principalement par une antibiothérapie. Les  $\beta$ -lactames (ampicilline, amoxicilline, pénicilline) et les aminoglycosides (gentamicine) sont souvent administrés en cocktails et procurent les meilleures chances de survie (Charlier et al., 2017). Les  $\beta$ -lactames bloquent les derniers stades de la synthèse du

peptidoglycane entraînant une perte de viabilité de *L. monocytogenes* (Korsak et al., 2010). Le cotrimoxazole, association de triméthoprime et de sulfaméthoxazole, est un traitement alternatif de la listériose capable de pénétrer par diffusion dans les cellules de mammifères et atteindre la bactérie (van de Beek et al., 2012).

### 1.4.3 Surveillance de la maladie chez l'Homme

Le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des maladies (ECDC, *European Center for Disease prevention and Control*) a pour objectif de recueillir et d'analyser les données sur les épidémies et des cas sporadiques de listériose chez l'Homme (EFSA, 2023; ECDC, 2024). En France, c'est Santé Publique France (SPF) qui recueille les données à l'échelle nationale (Santé Publique France, 2024).

Quand une souche de *L. monocytogenes* est isolée chez un patient, elle est envoyée au Centre National de Référence (CNR) des *Listeria* de l'Institut Pasteur pour une caractérisation sérologique ou génotypique (Roussel et al., 2012).

Depuis 1999, la listériose fait partie des 38 pathologies à déclaration obligatoire que tout représentant de la santé qui a connaissance d'un cas de listériose doit le signaler immédiatement à l'Agence Régionale de Santé (ARS) et à SFP (Code de la Santé Publique, n.d.). L'objectif de la déclaration obligatoire est de prévenir les risques d'épidémies, d'analyser l'évolution de la pathologie quand celle-ci survient et d'adapter les politiques de santé publiques si nécessaire (Santé Publique France, 2024). Lors d'une déclaration, des investigations sont menées dans le but d'identifier l'origine de la contamination : le type de produit incriminé, le comment et le pourquoi de cette contamination, pour proposer des solutions de maîtrise et de prévention (Santé Publique France, 2024).

La déclaration obligatoire permet d'obtenir des données épidémiologiques et de recenser les denrées alimentaires susceptibles de provoquer des listérioses. En 2022, 2 738 cas de listériose ont été signalés dans l'espace européen, dont 49% des cas ont été rapportés en Allemagne, en France et en Italie. Ces constatations font de cette

pathologie la cinquième zoonose la plus signalée en Europe (EFSA, 2023). En 2022, le taux d'incidence était de 0,62 cas pour 100 000 habitants, soit une augmentation de 15,9 % par rapport à 2021 (0,53 cas pour 100 000 habitants). De plus, le taux de mortalité était élevé (18,1%, en 2022), ce qui fait de la listériose une véritable préoccupation de santé publique (EFSA, 2023). Au cours de la même année, le nombre de cas de listériose en France était de 451, dont 73 décès, ce qui fait de la France, le pays avec le grand nombre de cas mortels (EFSA, 2023). Le nombre de cas signalés en France a significativement augmenté : 338, 373, 334 et 435 cas ont été signalés pour les années 2018, 2019, 2020 et 2021, respectivement (EFSA, 2023). Dans le tableau ci-dessous, les principales épidémies de listérioses (plus de dix cas signalés) survenues en France et l'aliment incriminé depuis les années 90 (Tableau 1-3) :

**Tableau 1-3.** Principales épidémies de listériose en France dont plus de 10 cas ont été signalés. Adapté de Koopmans et al. (2023); Leclercq et al. (2023); Piveteau (2017).

Type de produit	Aliment mis en cause	Année	Nombre de cas
<b>Viande et produits carnés</b>	Langue de porc en gelée	1992	279
	Rillettes de porc	1993	38
	Rillettes de porc	1999 2000	10
	Langue de porc en gelée	1999 2000	32
	Saucisse à tartiner (tartinettes)	2002	11
	Quenelles	2013	11
	Andouille	2015	13
	Charcuteries (jambon, chorizo, mortadelle)	2019 2020	14
<b>Produits laitiers</b>	Fromage à pâte molle (Brie)	1995	36
	Fromage à pâte molle (Livarot, Pont l'Évêque)	1997	14
	Fromage à pâte molle (Brie)	2002	11
	Fromage à pâte molle (Reblochon)	2016	21
	Fromage au lait de vache	2016	19
	Fromage à pâte molle (Brie au lait cru)	2018 2019	33
	Fromage à pâte molle (Munster)	2022	15

## 1.5 Sécurité microbiologique des aliments : focus sur *Listeria monocytogenes*

### 1.5.1 Le Paquet Hygiène

Les crises alimentaires ont conduit à développer un système de surveillance des aliments visant à rendre plus efficace la maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments. De ce fait, dans les années 2000, la Commission Européenne adopte le *Livre blanc sur la sécurité alimentaire* (EU Commission, 2000). Ce livre décrit les actions à mettre en place sur l'ensemble de la chaîne de production dans le but d'assurer une meilleure application de la législation et de garantir un niveau efficace de sécurité sanitaire des aliments pour une meilleure santé des consommateurs (EU Commission, 2000). Ce *Livre blanc* définit les grands principes suivants : une approche globale s'appliquant à tous les aspects liés aux produits alimentaires, « de la fourche à la fourchette » ; une définition complète du rôle de chaque acteur intervenant dans la chaîne alimentaire ; une traçabilité des aliments à chaque étape de la production ; une analyse des risques (évaluation, gestion, communication) ; une vérification de l'application de la législation et de sa mise en œuvre et une introduction à la notion de précaution (EU Commission, 2000).

Ce *Livre blanc* est un préquel aux textes régissant le Paquet Hygiène mis en place en 2006 et est applicable dans tous les États Membres (MASA, 2024b). Cette législation s'applique à l'ensemble de la filière agroalimentaire, de la production primaire (animale et végétale) jusqu'à la distribution aux consommateurs en passant par les usines agroalimentaires, les métiers de bouche et le transport (Raynaud, 2022; MASA, 2024b). Le Paquet Hygiène rassemble cinq règlements principaux :

(1) le règlement EC n°178/2002, aussi appelé *Food Law*, représente le « socle » du Paquet Hygiène (CE, 2002). Son objectif est de protéger la santé publique et les intérêts du consommateur par l'introduction de deux concepts : l'analyse des risques (évaluation des risques, gestion et communication auprès de la société) et le principe

de précaution (empêcher la distribution d'un produit dangereux ou susceptible d'être dangereux). Ce règlement a permis la création de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AES, EFSA pour *European Food Safety Authority*), l'équivalent européen de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses), et le Réseau d'Alerte Rapide Européen (RASFF). La *Food Law* stipule que seules les denrées alimentaires sûres doivent être mises sur le marché. Ce règlement contient également des dispositions générales sur la traçabilité des denrées alimentaires ou de tout ingrédient incorporé dans ceux-ci. Les exigences en termes de traçabilité sont aussi définies dans le règlement EC n°931/2011 (CE, 2011).

(2) Le règlement EC n°852/2004, relatif à l'hygiène des aliments et applicable à tous les exploitants du secteur alimentaire, quelles que soient les filières de production. Il exige la mise en place de procédures fondées sur les principes HACCP (détaillés plus bas) (CE, 2004a).

(3) Le règlement EC n°853/2004, relatif aux règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. Il spécifie l'obligation d'un agrément sanitaire (CE, 2004b).

(4) Le règlement EC n°1831/2003, qui établit des exigences en matière d'hygiène des aliments destinés aux animaux (CE, 2003a).

(5) Le règlement EC n°1831/2003, qui remplace les règlements EC n° 853/2004 et EC n°882/2004. Il établit les règles spécifiques pour les contrôles officiels servant à assurer le respect de la législation alimentaire et relative aux animaux (santé et bien-être des animaux, santé des végétaux, utilisation des produits phytopharmaceutiques) (CE, 2003).

## 1.5.2 Le Plan de Maîtrise Sanitaire

Le Paquet Hygiène fixe des objectifs généraux que doit atteindre chaque acteur de la filière agroalimentaire. Par conséquent, dans le but de simplifier les actions demandées pour une filière spécifique, un référentiel interne obligatoire nommé le Plan de Maîtrise Sanitaire, ou PMS, doit être écrit pour chaque établissement (Anonyme, 2013). Le PMS décrit l'ensemble des mesures prises par l'établissement afin de garantir l'hygiène et la sécurité sanitaire de ses productions vis-à-vis des dangers biologiques, physiques et chimiques (MEFSIN, 2024). Le PMS comprend trois niveaux : les mesures de Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH), les procédures fondées sur le principe de l'HACCP, et la traçabilité des produits.

Les BPH sont des mesures de maîtrise générales applicables de manière identique pour une filière donnée. Elles sont décrites dans des documents de référence dont l'objectif est de s'assurer que les conditions soient réunies pour travailler dans de bonnes conditions d'hygiène (MASA, 2024a). Les guides de BPH (GBHP) s'intéressent à l'ensemble des sources de contaminations du produit : matières premières, environnement de travail, personnel, milieu, maintenance des locaux et des équipements, les nuisibles ou encore la gestion des déchets (Anses, 2013; MASA, 2024a). La rédaction de ces guides est effectuée par des professionnels de la branche concernée, et évaluée par l'ANSES, puis validée par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) (Anses, 2013).

Le système HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point* ou « Analyse des dangers – Points critiques pour leur maîtrise ») est une méthode visant à prévoir les dangers biologiques, chimiques, physiques, allergènes, *Food Defense* et *Food Fraude* à chaque étape de la production pour mieux les maîtriser (MEFSIN, 2024). La réalisation d'un plan HACCP suit 7 principes détaillés en 12 phases : (1) analyser les dangers, (2) identifier des points critiques (CCP pour *Critical Control Point*), (3) établir les limites critiques attestant de la maîtrise de ces CCP, (4) établir un système de surveillance permettant de s'assurer de la maîtrise effective des CCP, (5) établir les actions



correctives à mettre en œuvre lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est plus maîtrisé, (6) établir les procédures spécifiques destinées à confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement, et (7) établir un système documentaire (procédures et enregistrements) approprié couvrant l'application des six principes précédents et est revu annuellement. (MEFSIN, 2024).

La traçabilité permet de retracer le chemin parcouru par un produit, des ingrédients à sa production, puis à sa distribution. L'ensemble des points qui concerne la traçabilité est détaillé dans le règlement EC n°931/2011 (CE, 2011). Afin de prévenir une épidémie, la traçabilité permet de procéder à un retrait ciblé et rapide des produits (CE, 2011).

### 1.5.3 Analyse microbiologique des aliments : cas de *L. monocytogenes*

Dans le but de garantir aux consommateurs la sûreté d'une denrée alimentaire, le règlement EC n°2073/2005 et son texte modificateur CE n°1441/2007 définissent les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (CE, 2005b, 2007). La réglementation concernant *L. monocytogenes* est particulière, puisqu'elle prévoit deux niveaux de critères de sécurité différents (absence dans 25 g et 100 UFC/g) applicables à deux stades différents (avant de quitter le contrôle de l'exploitant et pendant leur durée de conservation), en fonction du type d'aliment et de la population concernée. Les trois catégories de denrées alimentaires considérées sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1-4). La réglementation distingue les denrées permettant et ne permettant pas la croissance de la bactérie et les denrées destinées ou non aux nourrissons ou à des fins médicales. Bien que *L. monocytogenes* soit pathogène, sa présence à très faible dose est autorisée dans certains cas, contrairement aux autres pathogènes, tels que *Salmonella*, pour laquelle le critère est toujours une absence dans 25 g quel que soit le produit ou la population concernée.

**Tableau 1-4.** Critères de sécurité des denrées alimentaires pour *Listeria monocytogenes*, extrait du règlement EC n°2073/2005

Catégorie de denrées alimentaires	Plan d'échantillonnage (1)		Limites		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
	n	c	m	M		
Denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales spéciales (2)	10	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 11290-1	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Denrées alimentaires prêtes à être consommées pouvant favoriser le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	5	0	Absence dans 25 g (5)		EN/ISO 11290-1	Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'exploitant du secteur alimentaire qui l'a fabriqué
	5	0	100 UFC/g (4)		EN/ISO 11290-2	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales (2) (3)	5	0	100 UFC/g		EN/ISO 11290-2	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

(1) n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M (ici, m = M)

(2) Des essais périodiques fondés sur ce critère ne sont pas utiles, en temps normal, pour les denrées alimentaires prêtes à consommer suivantes: denrées alimentaires ayant fait l'objet d'un traitement thermique ou d'une autre transformation efficace pour éliminer *L. monocytogenes*, lorsque la recontamination n'est pas possible après ce traitement (par exemple, les produits traités thermiquement dans leur emballage final), fruits et légumes frais (non découpés et non transformés, à l'exception des graines germées), pain, biscuits et produits similaires, eaux, boissons non alcoolisées, bière, cidre, vin, boissons spiritueuses en bouteille ou conditionnés et produits similaires, sucre, miel et confiserie, y compris les produits à base de cacao et de chocolat, mollusques bivalves vivants.

(3) Les produits pour lesquels  $pH \leq 4,4$  ou  $a_w \leq 0,92$ , les produits pour lesquels  $pH \leq 5,0$  et  $a_w \leq 0,94$ , les produits à durée de conservation inférieure à 5 jours appartiennent automatiquement à cette catégorie. D'autres genres de produits peuvent aussi appartenir à cette catégorie, sous réserve d'une justification scientifique.

(4) Ce critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 UFC/g pendant toute la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé, des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 UFC ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation.

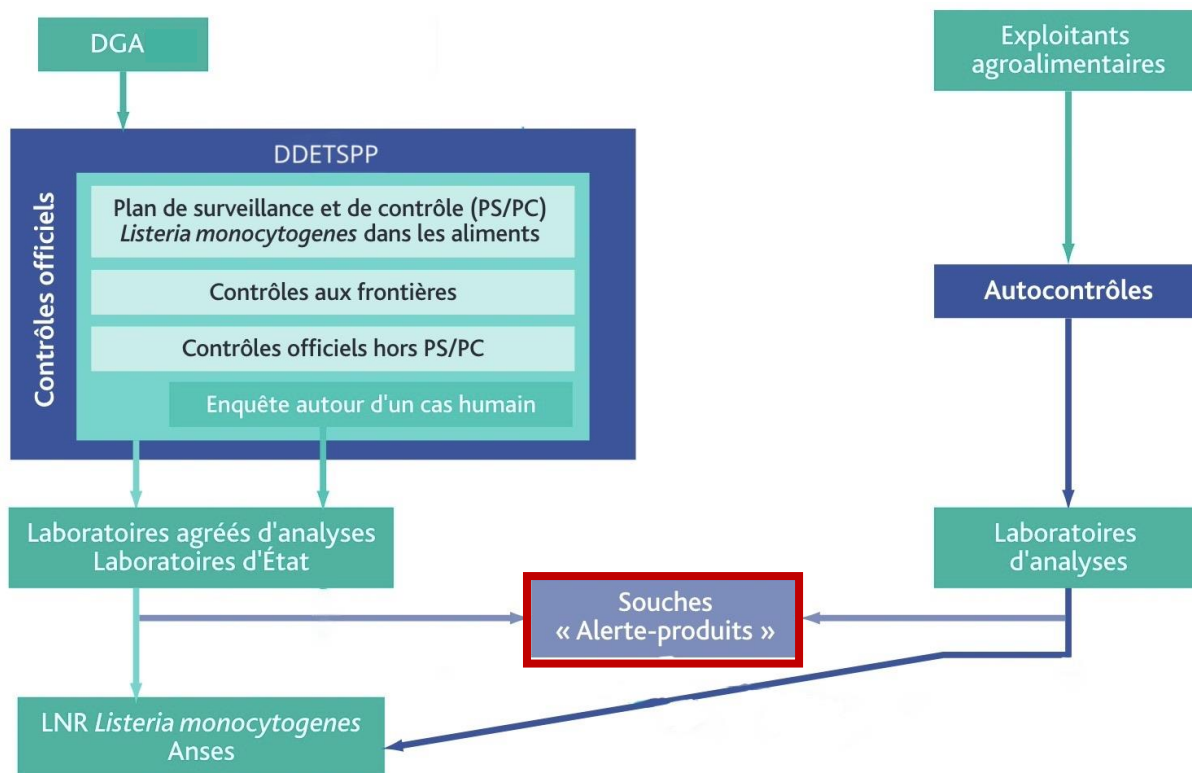
(5) Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils n'échappent à la maîtrise immédiate de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité

Comme mentionné dans le règlement EC n°2073/2005, deux méthodes d'analyse de référence (EN/ISO 11290-1 et EN/ISO 11290-2) sont disponibles pour le dénombrement et la détection de *L. monocytogenes* dans les denrées alimentaires (CE, 2005b). La norme ISO 11290-1, mise à jour en 2017, permet la recherche de *Listeria* spp., en ayant recours à des étapes d'enrichissement permettant d'atteindre une concentration minimale détectable (entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC/mL), puis d'un isolement sur des milieux gélosés sélectifs, dont le milieu ALOA et un second au choix du manipulateur comme par exemple PALCAM ou Oxford (ISO, 2017a). La norme ISO 11290-2 permet le dénombrement, et nécessite une étape de revivification, puis d'un isolement sur un milieu ALOA (ISO, 2017b). Cette méthode permet le calcul de la quantité de bactéries dans un gramme de produit. En complément, la norme V45-008 prévoit des ajustements pour le dénombrement de *L. monocytogenes* dans le saumon et la truite fumée lorsque les taux de contaminations sont faibles (entre 0,2 et 200 UFC/g) (AFNOR, 2009). Dans les deux applications (recherche et dénombrement), une étape finale de confirmation biochimique des colonies *L. monocytogenes* présumées doit être effectuée.

Des méthodes alternatives validées ont également été développées, en particulier des méthodes de détection moléculaires dans le but, entre autres, de réduire les temps d'analyse (Law et al., 2015). Ces méthodes reposent sur la détection de séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques à *L. monocytogenes*, et regroupe la PCR, la PCR multiplex (mPCR), la PCR quantitative (qPCR), les puces à ADN ou encore le séquençage (Law et al., 2015).

#### 1.5.4 Système de surveillance de *Listeria monocytogenes* dans les aliments en France

L'AESA a pour objectif est de recueillir et d'analyser les données sur la présence *L. monocytogenes* dans la chaîne alimentaire en Europe. En France, le dispositif de surveillance repose sur différents acteurs (Figure 1-6).



**Figure 1-6.** Dispositif de surveillance des contaminations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments en France (version adaptée de Roussel et al. (2012)).

La DGAI a mis en place des plans officiels de surveillance et de contrôle ciblés sur certaines denrées alimentaires sensibles au risque de *L. monocytogenes*. Par définition, un plan de surveillance (PS) permet d’obtenir une estimation de la contamination dans une production définie pour évaluer l’exposition des consommateurs à un risque particulier et identifier des mesures de gestion pour le maîtriser (DGAL, 2021). Un plan de contrôle (PC) permet d’évaluer l’efficacité des mesures de gestion précédemment mises en œuvre (DGAL, 2021). Des contrôles officiels peuvent également être effectués par la Direction Départementale de l’Emploi, du Travail, des Solidarités et de la Protection des Populations (DDETSPP). L’ensemble des prélèvements sont analysés par des laboratoires agréés ou des laboratoires d’État. Dans le cas où le produit ne respecte pas les critères microbiologiques, le produit est dit non-conforme et présente donc un risque pour la santé publique. Par conséquent, des mesures de retrait pour les produits présents chez les distributeurs (non mis en vente) et/ou de rappel pour les produits détenus par les consommateurs sont

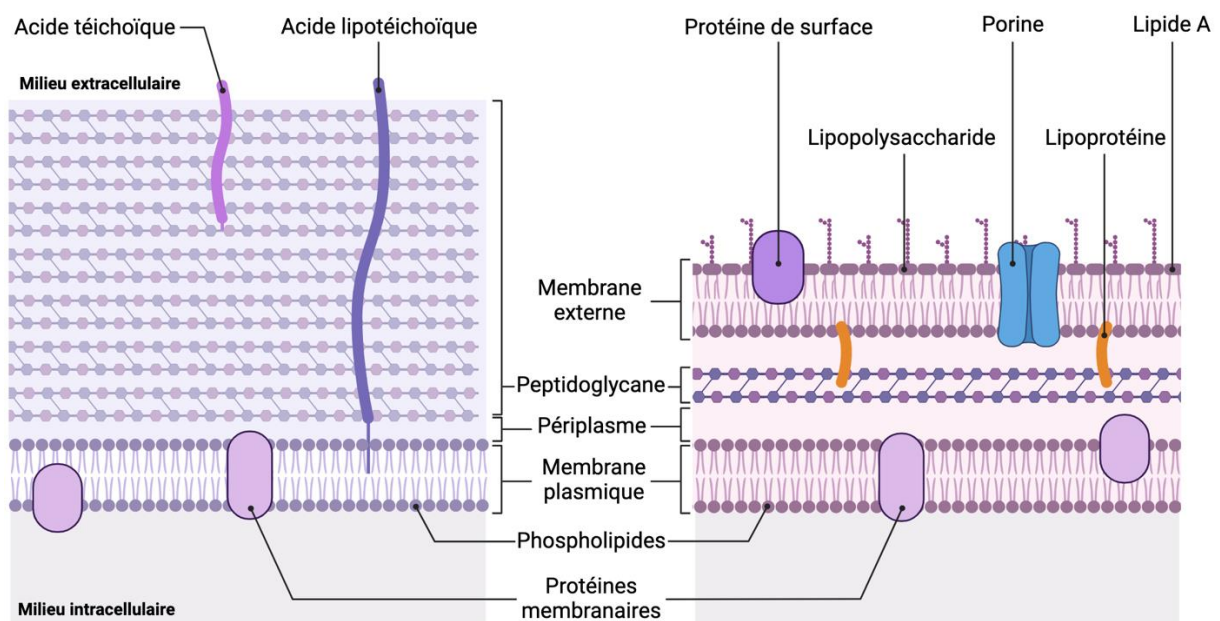
ordonnées. Les lots qui présentent un risque microbiologique sont détruits (MASA, n.d.). Les isolats pouvant être *L. monocytogenes* sont adressés au Laboratoire National de Référence (LNR) des *Listeria monocytogenes* de l'ANSES pour une caractérisation sérologique ou génotypique (Roussel et al., 2012). Les bilans périodiques des PS ont révélé, respectivement, des taux de contamination de 0,35% et 1,98%, pour des sandwiches et de la salade composé ou des produits de la mer (DGAL, 2021, 2022).

À l'échelle des exploitants agroalimentaires, chaque entité réalise des contrôles pour un produit donné d'après un plan de contrôle qui définit la fréquence, les critères et les méthodes. Les prélèvements effectués sont analysés par des laboratoires privés ou publics. Ces laboratoires sont souvent accrédités par le Comité Français de Certifications (COFRAC) certifiant que les analyses du produit ont été effectuées selon les normes en vigueur (en référence au Règlement EC 2073/2005) tout en respectant les bonnes pratiques de laboratoires (Cofrac, n.d.).

# **CHAPITRE 2**

## **La membrane bactérienne et sa régulation**

L'enveloppe cellulaire des bactéries est une structure multicouche complexe leur permettant de se protéger et d'échanger avec leur environnement (Silhavy et al., 2010). Les bactéries sont subdivisées en deux groupes : les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Figure 2-1). L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée de trois principales couches qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur : une membrane externe, en contact avec l'environnement, une paroi de peptidoglycane, et une membrane interne (plasmique) entourant le cytoplasme (Silhavy et al., 2010). L'enveloppe des bactéries à Gram positif ne dispose pas de membrane externe, mais est constituée d'une paroi de peptidoglycane beaucoup plus épaisse que celle des bactéries à Gram négatif et d'une membrane plasmique (Silhavy et al., 2010). Chez les bactéries à Gram positif, les acides téichoïques sont liés de manière covalente au peptidoglycane, et les acides lipotéichoïques sont ancrés aux groupes principaux des lipides de la membrane plasmique (Rohde, 2019). Chez les bactéries à Gram négatif, les lipoprotéines muréine, aussi nommées lipoprotéines de Braun, sont ancrées dans la membrane externe (Silhavy et al., 2010).



**Figure 2-1.** Structure de l'enveloppe bactérienne des bactéries à Gram positif (à gauche) et à Gram négatif (à droite). Figure créée avec BioRender.com.

## 2.1 Composition de la membrane cytoplasmique, biosynthèse et régulation

### 2.1.1 Structure et composition générale de la membrane cytoplasmique

La membrane plasmique est un élément clé des cellules (Silhavy et al., 2010). Quel que soit le microorganisme, la membrane cytoplasmique possède une structure générale commune : il s'agit d'une double couche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des protéines (Alberts, 2015). D'autres composants interviennent dans la composition de la membrane, tels que les ions ( $K^+$ ,  $Na^+$ ), l'eau et des glucides, mais à moindre mesure. La proportion de lipides et de protéines est à peu près similaire et représente chacun 50% de la composition membranaire (Silhavy et al., 2010; Strahl and Errington, 2017). Perméable, la membrane permet le transport passif ou actif de composés (nutriments ou déchets) (Rothfield, 1971). Elle joue également le rôle de messenger entre la bactérie et son environnement en détectant les diverses fluctuations du milieu extracellulaire (Rothfield, 1971).

Les glycérophospholipides sont les principaux composants lipidiques des membranes. Ce sont des lipides complexes contenant en plus des atomes précédents au moins un atome d'azote (N), de phosphore (P) ou de soufre (S) (Strahl and Errington, 2017). Ils sont organisés en bicouche et constituent la structure fluide de la membrane (Alberts, 2015). Ils déterminent les propriétés de la membrane, telles que la fluidité et la charge. Ces paramètres vont à leur tour modifier les interactions avec les protéines associées à la membrane (Strahl and Errington, 2017). L'homéostasie membranaire est principalement dépendante de la composition lipidique (Zhang and Rock, 2008a). Nous détaillerons dans les paragraphes suivants la structure des lipides et des acides gras qui les constituent, leur biosynthèse et leur régulation.

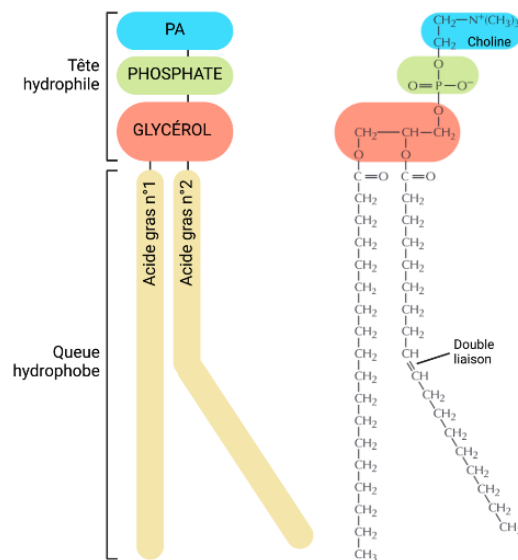
Tout comme les lipides, les protéines membranaires sont amphiphiles, possédant des régions hydrophobes et hydrophiles (Alberts, 2015). Elles varient considérablement dans leur structure et dans leur manière de s'associer à la bicouche



lipidique. En effet, plusieurs types de protéines membranaires existent : les protéines transmembranaires qui traversent l'intégralité de la bicouche lipidique, les protéines ancrées de façon covalente qui s'attachent à une des monocouches lipidiques, et les protéines ancrées de façon non covalente qui s'attachent à une autre protéine membranaire ou à la membrane (Vinothkumar and Henderson, 2010). Ces protéines sont responsables de la plupart des fonctions membranaires : transport de solutés, capteurs de signaux externes permettant à la cellule de modifier son comportement en réponse à des signaux environnementaux (Vinothkumar and Henderson, 2010; Alberts, 2015).

### 2.1.2 Les lipides complexes, composants clés de la membrane

Les glycérophospholipides, plus communément appelés les phospholipides, se caractérisent par un corps hydrophobe constitué de deux chaînes d'acides gras et par une tête hydrophile constituée d'un groupement glycérol, d'un phosphate et d'un dérivé d'acide phosphatidique (PA) (Figure 2-2) (Moussard, 2019). La famille des glycérophospholipides est vaste et se distingue principalement par le groupement dérivé de l'acide phosphatidique, désigné par le préfixe « phosphatidyl- » (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylglycérol) (Moussard, 2019). Chez les bactéries à Gram positif, le phosphatidylglycérol (PG) et la cardiolipine (CL) sont prédominants (Strahl and Errington, 2017). Les PG sont impliqués dans l'ancrage de certaines structures de surface, tels que les acides téichoïques. Les CL, association de deux PG, sont essentiels dans l'organisation dynamique des membranes bactériennes (Sohlenkamp and Geiger, 2016; López-Lara and Geiger, 2017).



**Figure 2-2.** Structure d'un glycérophospholipide, composée d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Le nom du phospholipide est déterminé par le dérivé de l'acide phosphatidique (PA, en bleu). Ici, il s'agit d'un phosphatidylcholine (à droite)

Tous les lipides bactériens ont une même origine métabolique et structurale. Ils sont tous composés d'acides gras, eux-mêmes synthétisés à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (Strahl and Errington, 2017)

### 2.1.2.1 Les acides gras membranaires

Les acides gras, composants de la queue hydrophobe des lipides, sont des acides organiques faibles qui possèdent un groupement carboxyle (fonction acide) et une chaîne aliphatique plus ou moins longue (Alais et al., 2020). De plus, les acides gras présentent des différences structurales conférant aux lipides qu'ils composent différentes propriétés (Figure 2-3).

La classification des acides gras se fonde sur le nombre d'atomes de carbone de la chaîne aliphatique et sur le niveau d'insaturation, c'est-à-dire le nombre de doubles liaisons carbone-carbone (C=C) dans la molécule (Akoh, 2017; Alais et al., 2020). Les acides gras peuvent être à chaîne courte (4 atomes de C), à chaîne moyenne (entre 6 et 12 atomes de C) à chaîne longue (entre 14 et 18 atomes de C) ou à très longue chaîne (plus de 20 atomes de C) (Chow, 2008). Les acides gras microbiens ont généralement une longueur de 12 à 24 carbones, dont les plus courants ont une

longueur de 14 à 20 carbones (Denich et al., 2003). Il est possible de distinguer les acides gras saturés (sans double liaison) (AGS) et les acides gras insaturés (avec doubles liaisons) (AGI). Parmi ces derniers, il est possible de retrouver les acides gras mono-insaturés (une seule double liaison) (AGMI) et les acides gras poly-insaturés (au moins deux doubles liaisons) (AGPI). De plus, la position de la double liaison confère une configuration *trans*- ou *cis*- de l'acide gras. La configuration est dite *cis*- si la double liaison est sur le même plan horizontal, alors que la configuration est dite *trans*-, si la double liaison est de part et d'autre du plan. Les AGI bactériens peuvent contenir jusqu'à six doubles liaisons, cependant, la poly-insaturation est rare et se produit principalement chez les bactéries marines (Denich et al., 2003). Des AGI de conformation *cis*- et de conformation *trans*- peuvent être retrouvés aussi bien que les bactéries à Gram positif que à Gram négatif (Keweloh and Heipieper, 1996; Denich et al., 2003; Kondakova et al., 2019). Par ailleurs, les acides gras peuvent être également ramifiés ou branchés (AGB). Un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) peut être présent sur le deuxième (ramification *iso*-) ou le troisième (ramification *anteiso*-) atome de C en partant de l'extrémité de la chaîne carbonée de l'acide gras. Les AGB sont les plus courants au sein de la membrane bactérienne des bactéries à Gram positif (Kaneda, 1991; Chow, 2008; Akoh, 2017). Enfin, il est possible de trouver dans certaines membranes bactériennes des acides gras cycliques à trois atomes de C (cycle propane) à la place de la double liaison C=C. Les acides gras cycliques sont majoritairement présents chez les bactéries à Gram négatif, telles que *Escherichia coli* ou chez les bactéries lactiques (Grogan and Cronan, 1997; Montanari et al., 2010). Ces derniers possèdent des propriétés similaires aux AGI de configuration *trans*- (Grogan and Cronan, 1997).

Les bactéries à Gram négatif contiennent une grande proportion d'acides gras cycliques, saturés et mono-insaturés et très peu d'acides gras branchés (Denich et al., 2003). À l'inverse, les bactéries à Gram positif possèdent une grande proportion d'acides gras branchés (jusqu'à 50% chez les Bacilliales et les Staphylococcales), mais rarement des acides gras cycliques. Chez *L. monocytogenes*, la membrane se compose

principalement d'acides gras branchés (plus de 50% des acides gras totaux), dont les plus abondants sont les *anteiso*-C15, *iso*-C15 et *anteiso*-C17, ainsi que d'acides gras saturés. Très peu d'acides gras insaturés sont retrouvés (inférieur à 3% des acides gras totaux) et aucun acide gras cyclique n'a été détecté (Chihib et al., 2003; Hingston et al., 2017; Touche et al., 2023).

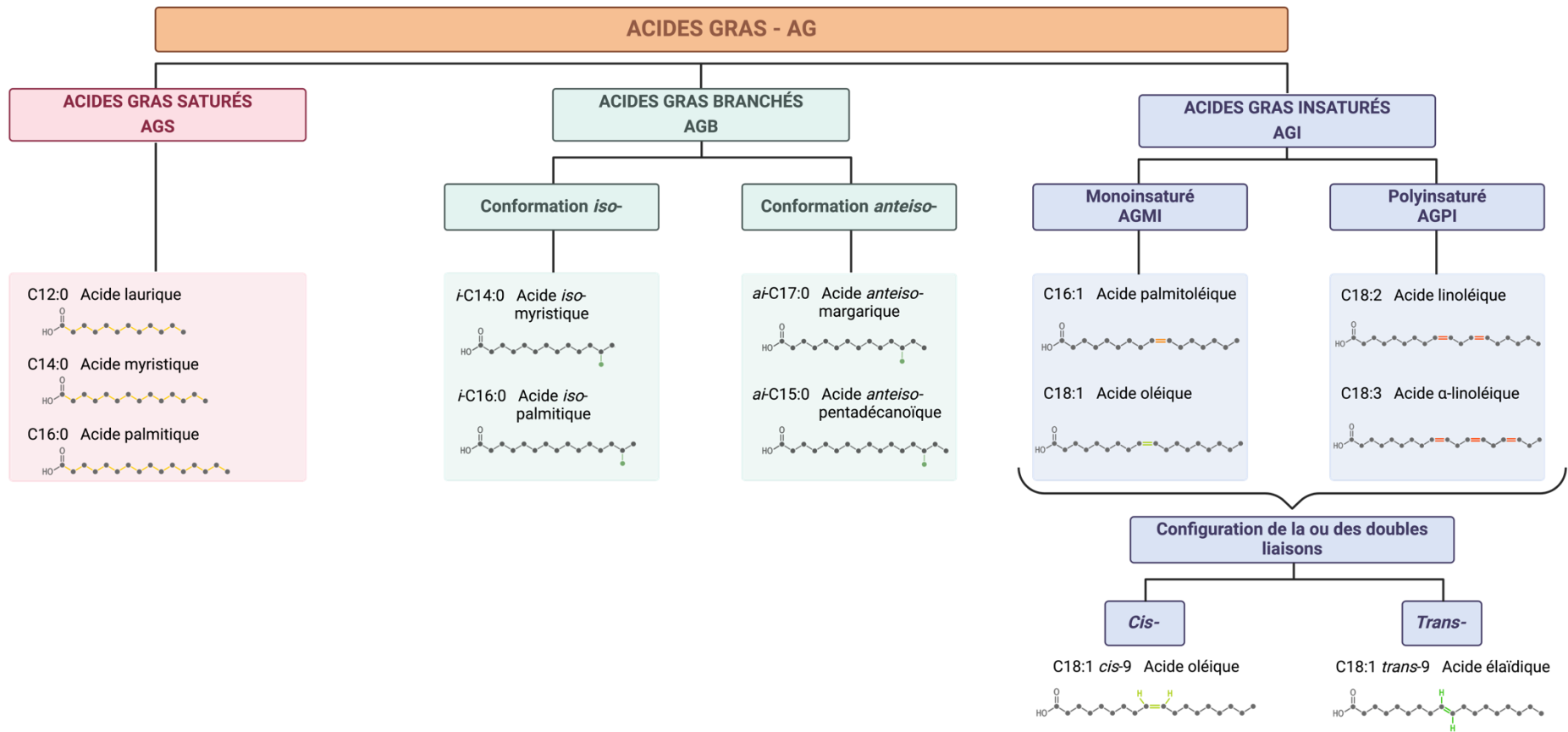


Figure 2-3. Exemple de différentes structures des acides gras

### 2.1.2.2 Point de fusion et fluidité membranaire

Le point de fusion, de l'anglais *melting point*, est une propriété des acides gras. Il s'agit de la température à laquelle la molécule passe de l'état solide à l'état liquide (Alais et al., 2020). Le point de fusion dépend de la longueur de la chaîne carbonée et de la présence du nombre de doubles liaisons (Denich et al., 2003). Plus la chaîne carbonée est longue, plus le point de fusion augmente. Plus le niveau d'insaturation est élevé, plus le point de fusion diminue. La fluidité membranaire dépend de la composition en acides gras et donc du point de fusion.

Il est possible de calculer une température de fusion de la membrane bactérienne. Il s'agit d'une température moyenne pondérée des points de fusion (WAMT, pour *Weighted Average Melt Temperature*) (Seel et al., 2018), calculée en pondérant les températures de fusion individuelles de chaque acide gras présent dans la membrane par leur proportion dans la membrane :

$$WAMT (^{\circ}C) = \sum_n^1 T_i * FA(\%)_i$$

Avec  $T_i$  la température de fusion de l'acide gras ( $^{\circ}C$ ) et  $FA(\%)_i$  la proportion en pourcentage de cet acide gras.

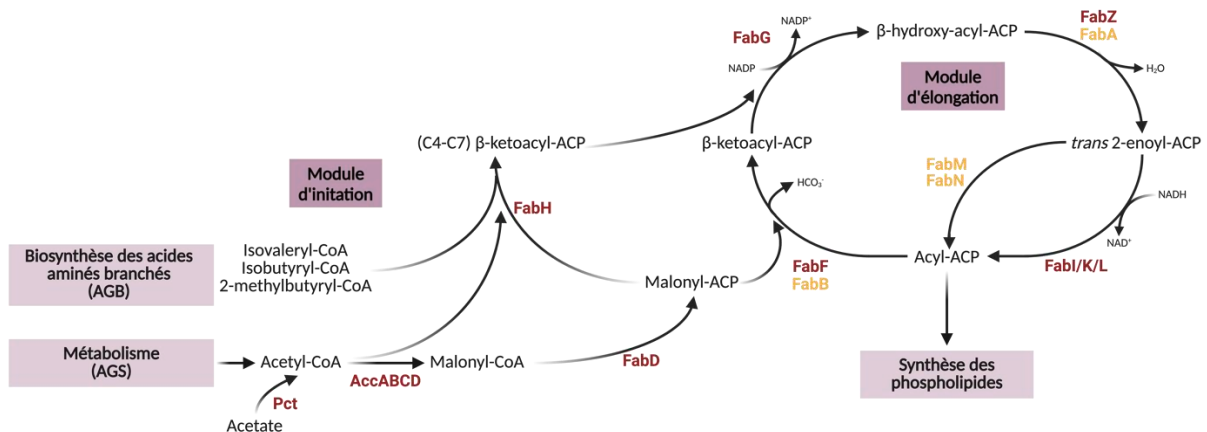
La WAMT est en lien direct avec la fluidité de la membrane bactérienne : une diminution de la WAMT est caractéristique d'une fluidification membranaire, au contraire, une augmentation de la WAMT est caractéristique d'une rigidification membranaire. Par conséquent, cette notion permet de prédire l'état physique de la membrane bactérienne. Il est important de noter que ce paramètre n'est pas identique à la température de fusion réelle de la membrane bactérienne, car celle-ci dépend également de la structure des têtes des phospholipides.

La membrane bactérienne dans un état dit « liquid-crystalline » correspond à un état optimal pour la physiologie bactérienne (Denich et al., 2003). Lors d'une augmentation de température, la membrane se fluidifie et passe dans un état dit « liquide » à cause d'un mouvement de rotation au niveau des liaisons C-C des chaînes acyles des glycérophospholipides (Denich et al., 2003).

## 2.1.3 Biosynthèse des lipides membranaires

### 2.1.3.1 Biosynthèse des acides gras

La voie de biosynthèse des acides gras, communément appelée FASII pour « *fatty acid synthesis type II* », se divise en deux modules : le module d'initiation et le module d'élongation (Figure 2-4). Les enzymes intervenant dans le module d'initiation sont communes à tous les genres bactériens, contrairement à celles intervenant dans le module d'élongation (Parsons et Rock 2013).



**Figure 2-4.** Biosynthèse des acides gras, FASII. La FASII est décomposée en deux modules : le module d'initiation et le module d'élongation. Les précurseurs du module d'initiation peuvent provenir soit du métabolisme pour la synthèse des acides gras saturés (AGS), soit par la voie de biosynthèse des acides aminés branchés pour la synthèse des acides gras branchés (AGB). Dans le module d'élongation, les enzymes en jaune correspondent à la synthèse des acides gras insaturés (AGI) dont FabA/FabB sont présentes chez les bactéries à Gram négatif et FabM ou FabN chez les bactéries à Gram positif. Le produit du cycle d'élongation, l'acyl-ACP rejoint ensuite la synthèse des phospholipides. Figure créée avec BioRender.com, d'après Parsons et Rock (2013) et Zhang et Rock (2008a).

### 2.1.3.1.1 *Le module d'initiation*

#### **Les acides gras à chaîne linéaire (saturés)**

Cette phase initiale permet de produire la première molécule, le malonyl-ACP, qui permet d'alimenter le module d'élongation. L'acétyl-CoA est une molécule clé du métabolisme cellulaire pouvant provenir entre autres de la conversion de l'acétate par la propionate-CoA-transférase. L'acétyl-CoA peut être utilisé dans de nombreuses réactions autres que la biosynthèse des acides gras, telles que le cycle de Krebs, la formation de pigments (chez certaines espèces bactériennes comme *S. aureus* pour la production de staphyloxanthine) (Krivoruchko et al., 2015).

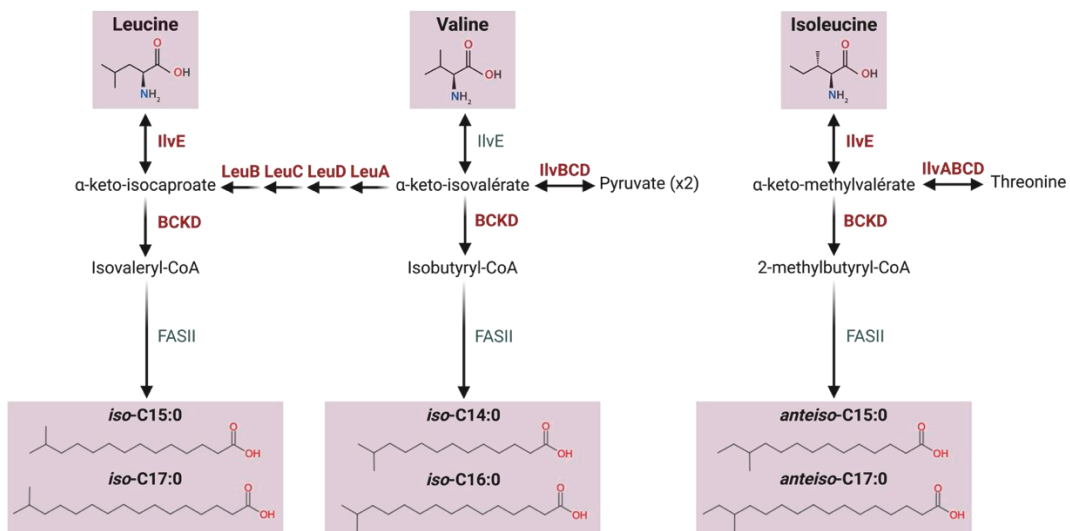
Tout d'abord, l'acétyl-CoA est carboxylé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) pour former du malonyl-CoA. L'enzyme ACC est un complexe enzymatique composé de quatre sous-unités codées par quatre gènes *accA*, *accB*, *accC* et *accD*. Ce complexe permet la réalisation de deux demi-réactions (carboxylation dépendante de la biotine, puis le transfert du groupement carboxyle) (Hingston et al., 2019; Parsons & Rock, 2013; Zhang & Rock, 2008a). Le malonyl-CoA est ensuite converti en malonyl-ACP par la transacylase FabD, puis est pris en charge par la synthase FabH afin de le convertir en  $\beta$ -ketoacyl-ACP : c'est le début du module d'élongation (Parsons and Rock, 2013). Les gènes codant les enzymes sont généralement très conservés entre espèces bactériennes (Marrakchi et al., 2002).

#### **Les acides gras à chaîne branchée**

La biosynthèse de ces acides gras se fait à partir de plusieurs acides aminés branchés : la valine, la leucine et l'isoleucine sont les précurseurs respectivement des acides gras branchés *iso*-C14/C16, *iso*-C15/C17 et *anteiso*-C15/C17 (Zhu et al., 2005) (Figure 2-5). Treize gènes, répartis en trois opérons, interviennent dans la conversion de l'acide aminé en métabolite dérivé du coenzyme A. Quel que soit l'acide aminé, la première réaction est réalisée par la même enzyme, IlvE, une amino-transférase aussi nommée BCAT pour « *branched-chain-amino-acid aminotransferase* ». Cette enzyme produit les intermédiaires  $\alpha$ -keto-isocaproate (KIC),  $\alpha$ -keto-isovalerate (KIV) et



$\alpha$ -keto-méthylvalérate (KMV) provenant respectivement de la leucine, la valine et l'isoleucine (Zhu et al., 2005). Ces molécules intermédiaires peuvent également provenir d'une autre source, autre que l'acide aminé branché. Par exemple, le KIV et le KMV peuvent provenir, soit de la conversion de deux molécules de pyruvate, soit de la conversion de la thréonine par l'action des enzymes IlvABCD. Le KIC peut aussi être converti en KIV par l'intervention des enzymes LeuABCD. Les intermédiaires KIV, KIC et KMV sont ensuite pris en charge par l'enzyme BCKD pour être transformé en métabolite du coenzyme A. BCKD, abréviation de « *branched-chain  $\alpha$ -ketoacid deshydrogenase* », est un complexe de trois enzymes réalisant une décarboxylation, un transfert d'acyle et une oxydo-réduction (Zhu et al., 2005). Chez *B. subtilis*, une mutation d'un des gènes codant cette enzyme a provoqué une auxotrophie en acides gras branchés (Diomandé et al., 2015). Le produit de l'enzyme BCKD est par la suite pris en charge par FabH et converti en  $\beta$ -ketoacyl-ACP pour rejoindre le cycle d'élongation (Kaneda, 1991; Zhu et al., 2005).



**Figure 2-5.** Biosynthèse des acides aminés branchés. Les précurseurs rejoignent la voie de biosynthèse des acides gras (FASII) et conduisent à la formation des acides gras branchés. Les enzymes sont représentées en rouge. Figure créée par BioRender.com, d'après Zhu et al. (2005).

### 2.1.3.1.2 *Le module d'élongation*

#### **Les acides gras saturés et à chaîne branchée**

Le module d'élongation est la machinerie centrale de la FASII (Parsons and Rock, 2013). Cette phase est composée de quatre réactions enzymatiques : une condensation, une réduction, une déshydratation et une seconde réduction dans le but est de synthétiser de l'acyl-ACP (Parsons and Rock, 2013). Chaque cycle d'élongation permet l'ajout de deux carbones à la chaîne acyle de l'acide gras en cours de formation. Les produits finaux sont nommés acyles ou acides gras (Cronan and Rock, 2008). Quelle que soit l'origine de la molécule  $\beta$ -cétoacyl-ACP (acétyl-CoA ou acides aminés branchés), le processus d'élongation de la chaîne acyle est identique.

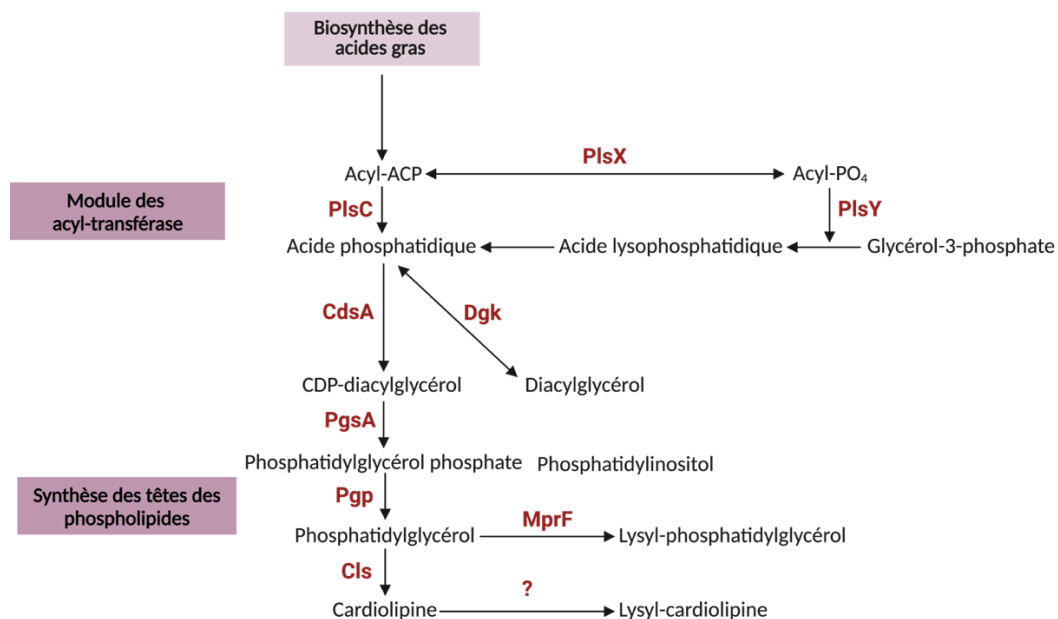
L'enzyme FabH, une  $\beta$ -cétoacyl-ACP synthase I, génère le  $\beta$ -cétoacyl-ACP. Cette molécule est réduite en  $\beta$ -hydroxy-acyl-ACP par FabG, une  $\beta$ -cétoacyl-ACP réductase dépendante du NADPH (Parsons and Rock, 2013). Le produit est ensuite déshydraté en *trans*-2-enoyl-ACP par la  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP déshydratase, FabZ chez *L. monocytogenes* ou *Streptococcus* spp. Les réactions de déshydratation étant facilement réversibles, le produit est directement pris en charge par l'enzyme suivante (Zhang and Rock, 2008a). La molécule *trans*-2-enoyl-ACP subit la seconde réduction pour être convertie en acyl-ACP par une enoyl-ACP réductase dépendante du NADH, FabI (Parsons and Rock, 2013). Cette enzyme est largement exprimée chez les bactéries, mais plusieurs isoformes peuvent être retrouvés, comme FabK, FabL ou FabV (Zhang and Rock, 2008a). Enfin, le devenir de l'acyl-ACP est dépendant de la longueur de sa chaîne carbonée. L'acyl-ACP peut, soit continuer le cycle d'élongation et être pris en charge par FabF, une  $\beta$ -cétoacyl-ACP synthase II, soit être dirigée vers le module des acyl-transférases pour la biosynthèse des lipides (Parsons and Rock, 2013).

#### **Les acides gras insaturés**

La synthèse des acides gras insaturés s'effectue grâce à une dérivation permettant de contourner certaines étapes du cycle d'élongation classique. Les enzymes intervenant pour la biosynthèse des acides gras insaturés sont dépendants

du genre bactérien, mais remplissent la même fonction : ajouter une double liaison au sein de la chaîne acyle de l'acide gras en formation. Chez les  $\gamma$ -protéobactéries, telles que *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, deux enzymes interviennent, le système FabA-FabB, contre une seule enzyme chez les Streptocoques avec FabM ou chez *Enterococcus faecalis* avec FabN (Zhang and Rock, 2008a; Parsons and Rock, 2013). FabA est une enzyme analogue à FabZ et intervient à la même étape que cette dernière, leur spécificité de substrat étant différente. FabB intervient après la formation de l'acyl-ACP, si celui-ci poursuit le cycle d'élongation (Zhang and Rock, 2008a). FabM ou FabN interviennent quant à elles au même niveau que FabK. Ces dernières entrent en compétition afin de maintenir l'équilibre entre les acides gras saturés et insaturés au sein de la membrane (Marrakchi et al., 2002). À ce jour, aucune voie de biosynthèse des acides gras insaturés n'a été mise en évidence chez *L. monocytogenes*.

### 2.1.3.2 Biosynthèse des phospholipides



**Figure 2-6.** Biosynthèse des lipides membranaires. Cette voie de biosynthèse se décompose en deux modules : le module des acyl-transférases permettant la formation de l'acide phosphatidique, et le module de biosynthèse des têtes des phospholipides. L'acyl-ACP provenant de la biosynthèse des acides gras est le précurseur de l'ensemble de cette voie de biosynthèse. Les enzymes sont représentées en rouge. L'enzyme « ? » est, à ce jour, non connue. Figure créée avec BioRender.com, d'après Parsons et Rock (2013) et Cronan et Rock (2008).

### 2.1.3.2.1 Module des acyl-transférases

La formation des phospholipides est initiée par le transfert du produit final de la FASII, l'acyl-ACP, vers le module des acyl-transférases. Deux systèmes existent : PlsB-PlsC et PlsX-PlsY-PlsC (Parsons and Rock, 2013). Une analyse des génomes provenant de 30 classes bactériennes distinctes a permis de démontrer que la voie PlsX-PlsY-PlsC est la plus répandue (Zhang and Rock, 2008b) . En effet, sur l'ensemble des classes, 17 classes possèdent la voie PlsX-PlsY-PlsC, alors que seule une classe, les Xanthomonadales, ne possède que la voie PlsB-PlsC (Zhang and Rock, 2008b). Les 12 classes restantes possèdent les deux voies. *L. monocytogenes* possède uniquement le système PlsX-PlsY-PlsC (Zhang and Rock, 2008b; Parsons and Rock, 2013) (Figure 2-6).

L'acyl-ACP est converti en acyl-phosphate (acyl-PO<sub>4</sub>) par PlsX, une glycérol-3-phosphate acyltransférase, localisée en périphérie de la membrane. L'acyl-PO<sub>4</sub> est utilisée par PlsY, une acyl-PO<sub>4</sub> acyl transférase dépendante du glycérol-3-phosphate, pour former de l'acide lyso-phosphatidique (Lyso-PA). Le Lyso-PA est converti en acide phosphatidique (PA) par PlsC, une 1-acyl-snglycérol-3-phosphate acyltransférase, en utilisant une seconde molécule d'acyl-ACP. Chez les  $\gamma$ -protéobactéries, PlsC peut également utiliser un acyl-CoA comme donneur d'acyl à la place de l'acyl-ACP (Parsons and Rock, 2013) (Figure 2-6).

La synthèse des différentes familles des phospholipides dépend des réactions successives à partir de l'acide phosphatidique.

### 2.1.3.2.2 Synthèse des têtes des phospholipides

Cette voie de biosynthèse permet de déterminer le groupement qui est associé au groupement phosphate de la tête du glycérophospholipide. La structure de base est le noyau de l'acide phosphatidique. La famille des glycérophospholipides est très vaste et changent d'un genre bactérien à l'autre. Chez les bactéries à Gram positif, le PG et la CL sont prédominants (Strahl and Errington, 2017). Chez *L. monocytogenes*, il est d'ailleurs possible de retrouver du lysyl-phosphatidylglycérol (LPG) et du lysyl-cardiolipine (LCL) (Sohlenkamp and Geiger, 2016) (Figure 2-6).

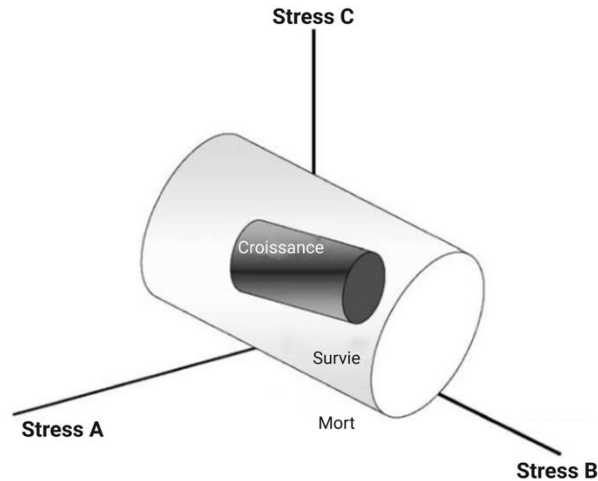
Le PA est converti en CDP-diacylglycérol par l'action de la transférase CdsA, lui-même transformé en phosphatidylglycérophosphate, puis converti en PG. La CL est formée par la condensation de deux molécules de PG par l'action de la Cls, la cardiolipine synthase (Cronan and Rock, 2008). Le LPG et le LCL sont le résultat d'une modification de la tête du PG par le transfert d'un acide aminé, ici la lysine. La transférase MprF permet le transfert de la lysine sur le PG. Au contraire, l'enzyme qui permet le transfert de l'acide aminé sur la CL n'est pas encore connue (Sohlenkamp and Geiger, 2016) (Figure 2-6).

## 2.2 Régulation de la composition membranaire en fonction de stress environnementaux

### 2.2.1 Le stress bactérien

Lorsque les bactéries sont dans un environnement qui leur est favorable, celles-ci peuvent se développer. Le terme « favorable » étant large et n'étant pas le même pour tous les microorganismes, le concept de « zone de confort » a été introduit (Booth, 2002). Cette « zone de confort » correspond à une niche avec une disponibilité en source d'énergie et en éléments constitutifs de la biomasse. Des facteurs propres à l'environnement tels que les paramètres physico-chimiques (température, pH, sel,  $a_w$ ...) et la présence d'autres flores microbiennes font également partie de la « zone de confort » (Booth, 2002).

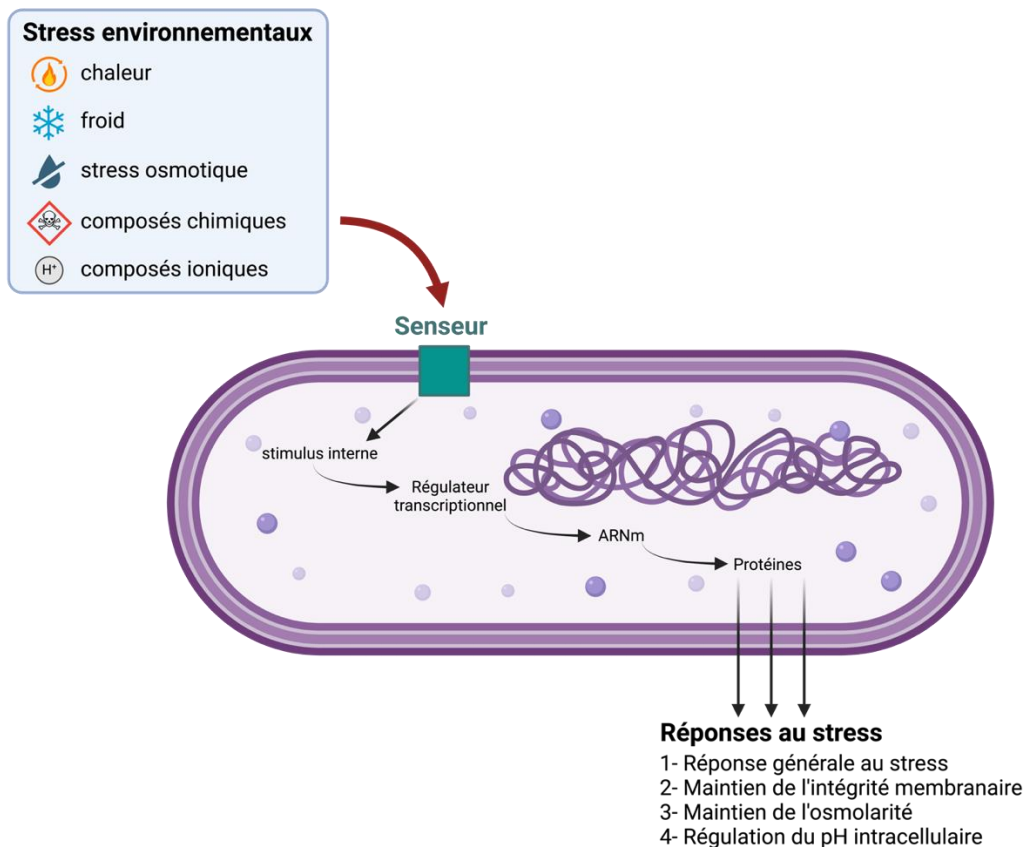
Un stress survient lorsqu'un de ces facteurs extérieurs est modifié, ce qui va perturber l'état physiologique de la bactérie, impactant sa croissance et sa survie par une altération de l'intégrité membranaire et/ou des acides nucléiques et/ou du repliement des protéines. La cellule tente alors de restaurer un profil métabolique qui serait favorable à sa survie, ou bien à une croissance plus rapide. Si l'intensité du stress est trop importante et que celle-ci dépasse les capacités de réponse de la bactérie, la mort cellulaire peut survenir (Booth, 2002). Le concept de notion de confort est illustré dans la figure suivante (Figure 2-7).



**Figure 2-7.** Notion de la zone de confort. Dans cette représentation, l'interaction entre les trois dimensions (stress A, B et C) produit des zones définies : zone positive (croissance), zone zéro (survie) et zone négative (mort). Pour exister dans les zones de croissance ou de survie, les cellules doivent s'adapter aux conditions environnementales. Figure adaptée de Booth (2002).

Afin de s'adapter et de survivre dans un large éventail de niches écologiques, les bactéries ont développé des mécanismes de réponses au stress. Une première réponse physique de la cellule est mise en place immédiatement et se traduit par une modulation de la fluidité membranaire, une dénaturation protéique et l'activation de transports membranaires. Puis, la bactérie entre dans une phase d'adaptation en modifiant l'expression de son génome.

Dans les aliments et les environnements agro-industriels, *L. monocytogenes* doit faire face à différents facteurs de stress abiotiques tels qu'un pH bas, des températures haute ou basse, de fortes concentrations en sel, la présence de molécules antimicrobiennes (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021). Comme tout microorganisme soumis à un stress, *L. monocytogenes* est capable de détecter le stress grâce un senseur puis de mettre en place réponse adaptée à la nature du stress. Son objectif est de restaurer son homéostasie, maintenir son intégrité membranaire et de réparer les dommages cellulaires, et d'éliminer l'agent responsable du stress le cas échéant. Cette réponse passe par la mise en place de mécanismes majeurs : une réponse générale aux stress environnementaux, la régulation de son pH interne et le maintien de l'osmolarité et de l'intégrité membranaire, (Figure 2-8) (cf. Chapitre 2 – 2.2.2).

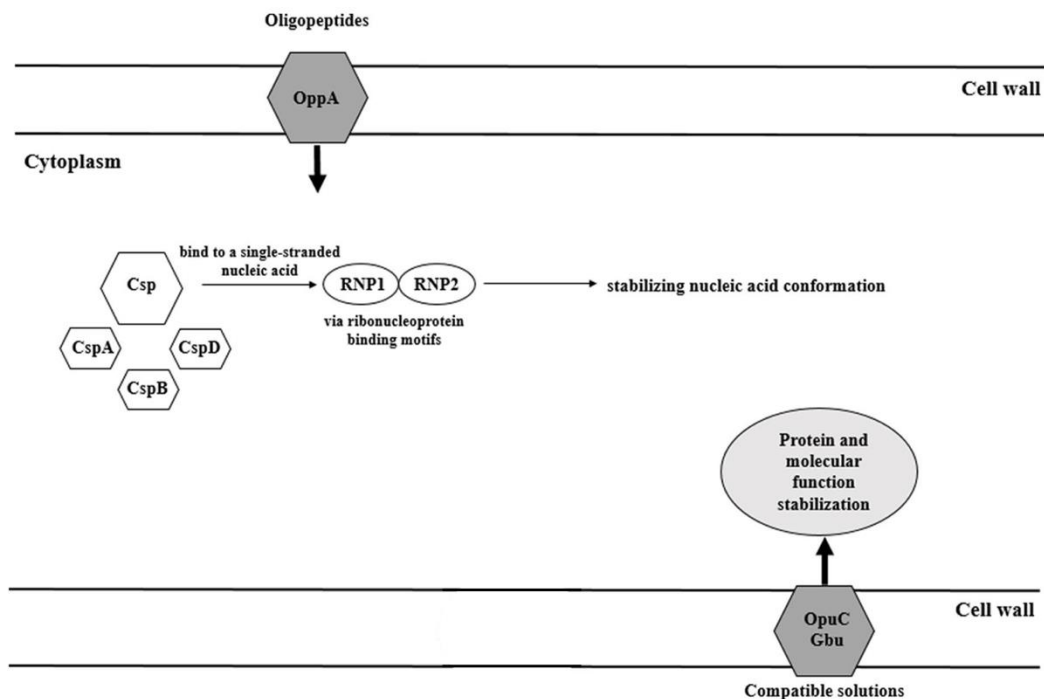


**Figure 2-8.** Mécanismes majeurs de la réponse aux stress environnementaux chez *L. monocytogenes*. Figure créée avec BioRender.com.

Chez *L. monocytogenes*, une part importante du génome est dédiée à la régulation de l'expression génique avec plus de 209 régulateurs transcriptionnels (7,3% du génome) et 16 systèmes à deux composants (TCS, *Two Component System*) (Glaser et al., 2001). L'expression des gènes liés au stress est régulée par les facteurs sigma  $\sigma$  alternatifs  $\sigma_B$ ,  $\sigma_C$ ,  $\sigma_H$  et  $\sigma_L$ , les répresseurs transcriptionnels CtsR et HrcA. Les TCS permettent à la bactérie de détecter et de s'adapter à une variété de facteurs de stress (Liu et al., 2019; Sibanda and Buys, 2022).

Parmi l'ensemble des facteurs  $\sigma$  alternatifs de *L. monocytogenes*, le facteur  $\sigma_B$  possède le plus grand régulon avec une régulation de plus de 300 gènes (Liu et al., 2019).  $\sigma_B$  joue un rôle essentiel dans la réponse générale au stress et l'adaptation des cellules bactériennes en intervenant dans une large gamme de conditions stressantes (acide, osmotique, choc thermique, oxydatif et nutritionnel) (Liu et al., 2019).

Pour son adaptation au stress froid, *L. monocytogenes* mobilise trois mécanismes : la modulation de la composition lipidique de sa membrane (cf. Chapitre 2 – 2.2.3), l'accumulation de solutés compatibles et la production de protéines de stress froid (CSP, *cold-shock proteins*). Les principaux solutés compatibles accumulés par *L. monocytogenes* sont la glycine, la bétaine et la carnitine (Tasara and Stephan, 2006). Le rôle exact des osmolytes et des oligopeptides accumulés par la cellule en réponse à un stress froid n'est pas encore totalement compris. Il semble qu'ils aient une fonction de cyprotection et de stabilisateur d'enzymes cytoplasmiques (Figure 2-9) (Tasara and Stephan, 2006; Sibanda and Buys, 2022).



**Figure 2-9.** Mécanismes de réponse au stress froid enclenchés par *L. monocytogenes* production de protéines de stress froid (CSP, *cold-shock protein*) ; accumulation de solutés compatibles tels que la carnitine par OpuC, la glycine bétaine par Gbu et les oligopeptides par OppA (d'après Wiktorczyk-Kapischke et al. (2021)).

Chez *L. monocytogenes*, trois familles de gènes *csp*, (*cspA* (ou *cspL*), *cspB* et *cspD*) ont été identifiées. Bien que leurs fonctions exactes ne soient pas encore entièrement élucidées, l'hypothèse actuelle est que ce sont des protéines se liant à l'ADN et l'ARNm. Elles agissent soit en tant que chaperons en se liant à l'ADN et à l'ARN pour limiter la formation de structures secondaires, soit comme des régulateurs



transcriptionnels ou post-transcriptionnels en se liant aux promoteurs ou aux régions 5'UTR afin de préserver les fonctions cellulaires, telles que la réplication de l'ADN, la transcription et l'initiation de la traduction dans des conditions de stress (Wouters et al., 2000). Malgré leur dénomination, ces protéines ne sont pas uniquement produites lors d'un stress froid. En effet, CspA est la plus induite lors d'un stress froid, alors que CspB est non inductible par le froid et est impliquée dans la virulence. CspD peut aussi bien agir en réponse à un stress qu'être impliquée dans la virulence (Wemekamp-Kamphuis et al., 2002; Muchaamba et al., 2021).

La régulation des gènes impliqués dans la réponse au stress froid chez *L. monocytogenes* fait intervenir les deux facteurs sigma alternatifs  $\sigma_L$  et  $\sigma_B$  (O'Byrne and Karatzas, 2008).

## 2.2.2 Aspects mécanistiques de la régulation de la biosynthèse membranaire

Les propriétés biophysiques de la membrane sont principalement déterminées par la composition en acides gras des glycérophospholipides (Strahl and Errington, 2017). Le maintien de l'homéostasie de la membrane passe par le contrôle de la voie de biosynthèse des acides gras. La synthèse des lipides membranaires nécessite un apport d'énergie conséquent, dont la majorité est requise pour la formation des acides gras (Yao and Rock, 2017). La FASII est contrôlée par des mécanismes biochimiques et génétiques (Zhang and Rock, 2008a).

### 2.2.2.1.1 Régulation biochimique

La régulation biochimique de la synthèse des acides gras repose sur le principe du rétrocontrôle négatif : le produit ou un intermédiaire inhibe l'action de l'enzyme située en amont. Cette régulation permet une réponse rapide et efficace quelle que soit la quantité d'enzymes et peut avoir lieu à plusieurs étapes de la voie de biosynthèse (Zhang and Rock, 2009).

Chez *E. coli*, le complexe ACC est inhibé par l'acyl-ACP. Cette inhibition est uniquement possible avec une protéine ACP d'origine bactérienne et acylée. Le complexe ACC est également inhibé par les acides gras présents dans le milieu extracellulaire (Yao and Rock, 2017). De plus, l'effet de l'inhibition par l'acyl-ACP est proportionnelle à la longueur de l'acide gras. En effet, une molécule d'acyl-ACP composée de 20 atomes de carbone aura une capacité d'inhibition de 70 à 80%, contre 20% lorsque la longueur est de 12 atomes de C. L'acyl-ACP a aussi un effet sur le contrôle de FabH, mais moins puissant que sur le complexe ACC (Parsons and Rock, 2013). FabF possédant une affinité plus faible pour les acides gras à chaîne longue, cela permet une régulation entre le module d'élongation de la biosynthèse des acides gras et le module des acyl-transférases (Parsons and Rock, 2013). Enfin, au niveau de la synthèse des têtes des phospholipides, l'ensemble des enzymes entre en compétition pour prendre en charge la conversion de cytidine diphosphate-diacylglycerol (CDP-DAG). À ce jour, il n'y a aucune connaissance sur une régulation biochimique du système MprF (Zhang and Rock, 2008a).

#### *2.2.2.1.2 Régulation transcriptionnelle*

Au sein des bactéries à Gram positif, la régulation transcriptionnelle se sépare en deux groupes : le rétrocontrôle par le répresseur FabT chez les Streptocoques, les Entérocoques et les Lactocoques ou le rétrocontrôle par le répresseur FapR chez les Staphylocoques et les Bacilles (Fujita et al., 2007). Chez *L. monocytogenes*, il s'agit d'une régulation transcriptionnelle par FapR, dont le gène est homologue à celui de *B. subtilis* (Fujita et al., 2007).

FabT, régulateur membre de la famille MarR « *Multiple antibiotic resistance Regulator* », se fixe à des sites spécifiques de l'ADN, ce qui empêche le recrutement de l'ARN polymérase (Lambert et al., 2022). Sa fixation à l'ADN nécessite la présence de l'acyl-ACP qui joue le rôle de co-répresseur. La formation du complexe FabT-(acyl-ACP) provoque un changement de conformation de FabT favorisant ainsi sa fixation. Une corrélation est observée entre l'augmentation de la quantité d'acyl-ACP et l'affinité de

FabT à l'ADN. FabT et son expression génique sont également régulées par des TCS, tels que VicRK, ou par la présence d'acides gras exogènes (Lambert et al., 2022).

Chez de nombreuses bactéries à Gram positif, FapR est conservé (Albanesi and de Mendoza, 2016). Il est le régulateur global des gènes de la biosynthèse des acides gras (*acpA*, *fabD*, *fabF*, *fabG*, *fabH*, *fabI*) et de certaines étapes de la biosynthèse des phospholipides (*plsC*, *plsX*) ainsi que de sa propre régulation (Zhang and Rock, 2009). Tout comme le régulateur FabT, une corrélation a été observée entre FapR et une molécule du métabolisme des acides gras, ici le malonyl-CoA. En effet, si un inhibiteur de FabF (cycle d'élongation de la biosynthèse des acides gras) est ajouté dans des cultures de *B. subtilis* ou *S. aureus*, alors il y a une accumulation de malonyl-CoA et une augmentation de l'expression des gènes régulés par FapR (Parsons and Rock, 2013). L'analyse structurale de FapR a révélé la présence d'un « hot-dog fold » caractéristique des enzymes de type thioestérase (Albanesi and de Mendoza, 2016). Le malonyl-CoA se lie à ce domaine, ce qui déclenche un changement de conformation de FapR (séparation des domaines de liaisons à l'ADN), empêchant son action régulatrice (Albanesi and de Mendoza, 2016). Ces observations suggèrent alors que la concentration intracellulaire de malonyl-CoA régule, par l'intermédiaire de FapR, la voie de biosynthèse des acides gras. Néanmoins, la régulation de cette concentration n'est pas encore connue, même si des hypothèses telles qu'une inhibition par la molécule elle-même ou par l'acyl-ACP ont été évoquées (Parsons and Rock, 2013). Enfin, bien qu'une régulation biochimique du système MprF ne soit pas connue, des pistes sont envisagées sur une régulation transcriptionnelle. Chez *S. aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, le système à trois composants ApsRSV induirait la transcription du gène *mprF* ainsi que les gènes impliqués dans le métabolisme de la lysine (Parsons and Rock, 2013). Aucune étude n'a encore été publiée sur la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des acides gras chez *L. monocytogenes*.

### 2.2.2.1.3 Régulation post-synthétique

Chez certaines espèces de *Bacillus*, des désaturases de phospholipides ont été mises en évidence (Diaz et al., 2002). Ces enzymes permettent l'introduction de doubles liaisons dans la chaîne acyle des acides gras d'un glycérophospholipide existant. *B. subtilis* possède une désaturase, nommée Des, capable d'insérer une double liaison en position  $\Delta 5$  de la chaîne acyle de l'acide gras (Mansilla et al., 2003). Chez *B. cereus*, deux désaturases ont été identifiées : DesA remplissant la même fonction que Des et DesB qui quant à elle introduit une double liaison en position  $\Delta 10$  (Diomandé et al., 2016). Lors du processus d'introduction de double liaison, les désaturases recrutent et activent l'oxygène moléculaire à l'aide d'un site actif spécifique au fer (Diaz et al., 2002; Chazarreta-Cifre et al., 2011).

Des enzymes de type *cis-trans* isomérasas, ou Cti, ont également été identifiées. Ces enzymes catalysent la conversion des doubles liaisons des AGI de conformation *cis-* à la conformation *trans* (Zhang and Rock, 2008a). Les AGI de conformation *trans-* engendrent une rigidification de la membrane en comparaison de la position *cis-* (Cronan and Gelmann, 1975). Cette enzyme est présente chez certaines bactéries à Gram négatif, notamment dans les genres *Pseudomonas* et *Vibrio* (Junker and Ramos, 1999; Heipieper et al., 2003). Son expression est constitutive et permet une augmentation des AGI de conformation *trans-* en réponse à un changement de température ou à une exposition à des solvants (Kiran et al., 2005). Les AGI de conformation *trans-* ne peuvent pas être reconverti en conformation *cis-*. Par conséquent, lorsque le stress environnemental n'est plus présent, les AGI de conformation *cis-* doivent être re-synthétisés (Zhang and Rock, 2008a).

L'enzyme Cfa, pour *cyclopropane fatty acid synthase*, présente chez *E. coli*, *E. faecalis*, les bactéries lactiques ou les Salmonelles, permet la conversion des AGI de configuration *cis-* en acides gras cycliques (cyclopropane) par le transfert d'un groupement méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine vers la double liaison d'une chaîne acyle de l'acide gras (Grogan and Cronan, 1997; Kim et al., 2005; Montanari et

al., 2010). Le gène *cfa* est contrôlé par le facteur de transcription RpoS et la phase de croissance (transcription activée lorsque les cellules entrent en phase stationnaire), mais également par certains stress environnementaux, tels qu'un pH acide ou la présence de solvant ou d'éthanol (Zhang and Rock, 2008a; Pini et al., 2009; Grandvalet et al., 2008). Aucun mécanisme permettant la conversion de l'AGI cyclique en configuration *cis* n'a été mis en évidence.

### 2.2.3 Adaptation membranaire face à la température

La température est l'un des facteurs essentiels à la croissance microbienne. Chaque espèce bactérienne possède des températures minimale ( $T_{\min}$ ), optimale ( $T_{\text{opt}}$ ) et maximale ( $T_{\max}$ ) de croissance (Tortora et al., 2018).  $T_{\min}$  est la température la plus basse à laquelle l'espèce peut se développer, à l'inverse  $T_{\max}$  est la plus élevée. La température optimale est la température à laquelle la bactérie croît le plus rapidement, c'est-à-dire la température pour laquelle le taux de croissance ( $\mu_{\max}$ ) est le plus élevé (Tortora et al., 2018). En fonction de ces valeurs cardinales, plusieurs classes de microorganismes sont distingués : les psychrophiles ( $T_{\min} = -10^{\circ}\text{C}$  ;  $T_{\text{opt}} = 10$  à  $15^{\circ}\text{C}$  ;  $T_{\max} = 18$  à  $20^{\circ}\text{C}$ ), les mésophiles ( $T_{\min} = 5^{\circ}\text{C}$  à  $10^{\circ}\text{C}$  ;  $T_{\text{opt}} = 25$  à  $40^{\circ}\text{C}$  ;  $T_{\max} = 44$  à  $50^{\circ}\text{C}$ ) et les thermophiles ( $T_{\min} = 30$  à  $40^{\circ}\text{C}$  ;  $T_{\text{opt}} = 55$  à  $60^{\circ}\text{C}$  ;  $T_{\max} = 60$  à  $90^{\circ}\text{C}$ ) (Naïtali et al., 2017). Parmi les microorganismes mésophiles, il est possible de distinguer une catégorie de microorganismes psychrotrophes, qui malgré une température optimale autour de  $30^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ , sont capables de se développer de manière significative à des températures inférieures à  $7^{\circ}\text{C}$ , comme c'est le cas de *L. monocytogenes* (Bornert, 2000). De la même manière, il existe des microorganismes thermotrophes capables de se développer significativement à des températures élevées (entre  $45^{\circ}\text{C}$  et  $50^{\circ}\text{C}$ ), tels que *Clostridium perfringens*.

Une diminution des températures induit un stress froid à la bactérie, lui faisant quitter sa « zone de confort » et limitant ainsi son développement. L'exposition des microorganismes à des basses températures entraîne en premier lieu des changements au niveau de la membrane (Tasara and Stephan, 2006). La membrane bactérienne se

rigidifie et passe d'un état « liquid-crystalline » à un état de gel à cause d'une réduction du mouvement des chaînes acyle empêchant la bactérie d'interagir avec son milieu environnant (Denich et al., 2003). Or, les fonctions assurées par la membrane, telles que le transport de molécules extracellulaires vers le milieu intracellulaire, nécessitent une certaine fluidité de la membrane. En vue de rétablir les échanges avec son environnement et de pallier cette rigidification membranaire, la bactérie change la composition de ses lipides membranaires. Plusieurs modifications des acides gras peuvent être adoptées : (1) modification de la longueur de la chaîne acyle de l'acide gras et/ou (2) modification des rapports entre les types d'acides gras (AGB/AGS ; *anteiso*-AGB/*iso*-AGB ; AGI/AGS) et/ou (3) modification de la conformation de l'insaturation (*trans*-AGI/*cis*-AGI) (Suutari and Laakso, 1994; Tasara and Stephan, 2006).

Chez *L. monocytogenes*, l'adaptation aux basses températures se fait par un changement de ramification des acides gras branchés en privilégiant les ramifications *anteiso*- et/ou par un raccourcissement de la longueur de la chaîne acyle (Püttmann et al., 1993; Bayles et al., 1996; Annous et al., 1997; Neunlist et al., 2005; Touche et al., 2023). L'augmentation de la proportion de *anteiso*-C15:0 se fait au détriment des *anteiso*-C17:0 lors d'une croissance à basse température (4°C ou 10°C) par rapport à une température optimale (30°C ou 37°C) (Püttmann et al., 1993; Jones et al., 1997; Chihib et al., 2003). Une diminution de la longueur de la chaîne acyl des acides gras est également observé lors d'une croissance à 10°C par rapport à 37°C (Jones et al., 1997). Deux mutants sensibles au froid, capables de se développer à 37°C mais pas à 10°C, présentent des déficiences en acides gras branchés, en particulier en *anteiso*-C15:0 et *anteiso*-C17:0, à 37°C (Annous et al., 1997). Néanmoins, la supplémentation en acide 2-méthylbutyrique, permettant la synthèse du 2-méthylbutyryl-CoA (cf. Biosynthèse des acides gras branchés, Figure 2-5), permet de restaurer la composition membranes des cellules mutantes et ainsi la croissance à 10°C (Annous et al., 1997). L'analyse transcriptomique de *L. monocytogenes* à différentes phases de croissance lors d'un passage de 20°C à 4°C a montré une augmentation de l'expression des gènes des opérons *ilvABCDH* et *leuABCD* à toutes les phases de croissance, en particulier dès la

fin de la phase exponentielle (Hingston et al., 2017). Ces surexpressions étaient cohérentes avec les profils membranaires observés, c'est-à-dire une augmentation de la proportion en *anteiso*-C15:0 et une diminution des *iso*-C15:0/ *iso*-C17:0 à 4°C par rapport à 20°C (Hingston et al., 2017).

Chez certaines espèces de *Bacillus*, l'exposition à des basses températures induit la désaturation des acides gras des phospholipides. Les gènes *desA* et *desB* sont régulés par le TCS DesKR chez *B. subtilis* ou le TCS CasKR chez *B. cereus*. Le TCS DesKR est le premier système décrit comme étant impliqué dans l'adaptation au froid *via* le contrôle de l'insaturation des acides gras (Aguilar et al., 2001). Le senseur DesK est une histidine kinase trans-membranaire capable de s'autophosphoryler lorsqu'elle sent une baisse de la fluidité membranaire pendant un stress froid (Mansilla et al., 2003). Le groupement phosphate à DesR. Une fois phosphorylé, il est actif et se fixe sur la séquence promotrice de ces gènes cibles pour induire leur expression ce qui permet une augmentation de la proportion en AGI et le retour à une fluidité membranaire optimale (Mansilla et al., 2003). La mutation de CasKR chez *B. cereus* supprime la capacité de croissance à basse température (Diomandé et al., 2014). Le mutant  $\Delta casR$  est incapable de croître à 10°C même après 12 jours d'incubation, alors que la souche sauvage atteint la phase stationnaire au bout de 8 jours (Diomandé et al., 2014). Chez *L. monocytogenes*, aucun système de désaturase n'a été mis en évidence à ce jour.

#### 2.2.4 Adaptation membranaire face à des composés hydrophobes

L'adaptation de la membrane bactérienne face à des composés hydrophobes permet à la bactérie de survivre dans des environnements contenant des solvants organiques ou des antibiotiques. Ces substances interagissent avec la membrane et perturbent sa structure et sa fonction (Denich et al., 2003). Plusieurs stratégies existent pour contrer l'effet de ces composés hydrophobes : (1) empêcher ou réduire la pénétration du composé en modifiant la perméabilité membranaire, et/ou (2) former des vésicules extracellulaires stockant le composé, et/ou (3) expulser le composé à l'aide de pompe à efflux (Ramos et al., 2002). Face à un composé toxique, l'adaptation

membranaire est différente de l'adaptation à de basses températures. Les bactéries augmentent la proportion en AGS (et en AGI de conformation *trans*-) afin d'augmenter la rigidité membranaire. L'augmentation de la rigidité membranaire rend la membrane moins perméable, réduisant ainsi l'entrée et l'incorporation des composés hydrophobes toxiques (Denich et al., 2003). Chez *Enterococcus faecium*, une augmentation de la proportion en AGS est observée lors d'une exposition à la daptomycine (antibiotique avec une queue hydrophobe), lui conférant ainsi une résistance (Mishra et al., 2012).



# **CHAPITRE 3**

## **Impact des acides gras exogènes**

### 3.1 Les lipides des aliments

Un aliment est un assemblage complexe et hétérogène qui peut être décrit par sa composition chimique et structurale (Ubbink et al., 2008). En effet, la caractérisation d'un aliment demande une description fine de sa composition, même si celle-ci s'avère insuffisante pour décrire les liens entre composition et propriétés nutritionnelles et organoleptiques (Fardet et al., 2013). Il faut y rajouter la notion de structure de l'aliment, qui est généralement présentée en trois niveaux: la structure moléculaire (nature des molécules et leur arrangement), la structure microscopique (interactions entre les principaux constituants) et la structure macroscopique (visible à l'œil nu) (Fardet, 2015). Les systèmes alimentaires offrent ainsi une grande diversité de microarchitectures, avec des systèmes liquides aqueux avec ou sans épaississants (soupes ou jus de fruits), des gels aqueux (pâtés), des émulsions huile dans l'eau (sauce salade ou mayonnaise), des émulsions eau dans l'huile (beurre), des émulsions gélifiées (saucisse, fromage) (Wilson et al., 2002; Saint-Martin et al., 2022).

A l'échelle microscopique, une matrice alimentaire complexe peut-être considérée comme un assemblage de plusieurs systèmes juxtaposés, chacun d'eux ayant ses propres caractéristiques physiques et chimiques. Les microorganismes présents y rencontrent des gradients de différentes ressources nutritionnelles et conditions physico-chimiques (température, pH, oxygène,  $a_w$ ) (Brocklehurst et al., 1995). Par conséquent, les microorganismes, en particulier les bactéries, doivent s'adapter à cet environnement en modifiant leur activité métabolique (Brocklehurst et al., 1995; Malakar et al., 2000) (Cf. Chapitre 2 – 2.2.2).

Les lipides sont présents dans de nombreux aliments et jouent de multiples rôles en contribuant à la structure, à la texture et au pouvoir lubrifiant (Aguilera, 2019). De plus, ils agissent comme une barrière contre l'humidité et comme support lipophile aux vitamines et aux arômes (Aguilera, 2019). Les lipides sont généralement présents sous des formes estérifiés comme des tensioactifs (polysorbates ou Tween®), des phospholipides ou des triglycérides (Akoh, 2017). Au sein de la matrice alimentaire, les

triglycérides sont principalement piégés dans des gouttelettes de graisse (émulsion), alors que les tensioactifs et les phospholipides se positionnent à leur surface ou sont dispersés dans la phase aqueuse (Saint-Martin et al., 2022). De plus, par l'action de lipases d'origine végétale, animale ou bactérienne, les tensioactifs et les phospholipides peuvent être partiellement décomposés en acides gras libres répartis de manière hétérogène au sein de la matrice alimentaire (Akoh, 2017). Il existe de nombreux types d'acides gras dans la composition des matières premières d'origine végétale ou animale. Par exemple, les AGI sont présents en grandes proportions dans les huiles végétales, telles que l'huile d'olive (76 % des AG totaux), d'arachide (48,7 % des AG totaux) et de tournesol (15,3 % des AG totaux) (Zambiasi et al., 2007). Le tableau suivant présente la composition moyenne en acides gras de différents corps gras végétaux et animaux (Tableau 3-1).

**Tableau 3-1.** Composition en acides gras de quelques produits alimentaires d'origine végétale ou animale. Les proportions sont des moyennes, exprimées en pourcentage total. Seules les valeurs supérieures à 1% sont indiquées. Adaptation de Cuvelier et al. (2004); Zambiasi et al. (2007).

		Origine végétale					Origine animale			
		Huile d'olive	Huile de colza	Huile de tournesol	Huile d'arachide	Huile de palme	Lait de vache	Beurre	Saindoux	Huile de foie de morue
Acides gras saturés	C4 à C10 <sup>(a)</sup>	-	-	-	-	-	8,8	9	-	-
	C12 acide laurique	-	-	-	-	-	4,4	3	-	-
	C14 acide myristique	-	-	-	-	1,1	13,5	10	1,3	2,8
	C16 acide palmitique	10,8	3,8	5,8	9,4	42,7	33,9	3	24,0	11,6
	C18 acide stéarique	3,6	1,9	4,8	2,7	4,6	9,5	10	13,0	2,7
	Autres <sup>(b)</sup>	-	1,3	1,3	6,2	1	-	2	-	-
Acides gras insaturés	C14:1 acide myristoléique	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-
	C16:1 acide palmitoléique	-	-	-	-	-	1,5	2	2,8	8,6
	C18:1 acide oléique	75,6	62,4	16,9	48,7	-	23,2	30	43,5	25,2
	C20:1 acide gadoléique	-	1,5	-	1,3	-	-	-	-	13,1
	C22:1 acide cétoléique	-	-	-	-	-	-	-	-	6,3
	C18:2 acide linoléique	7	20,1	70,7	31,1	-	2,6	2	11,2	2,5
	C18:3 acide linoléique	-	8,4	-	-	-	-	-	1,3	-
	C20:5 acide eicosapentaénoïque EPA	-	-	-	-	-	-	-	-	9,3
	C22:6 acide docosahexaénoïque DHA	-	-	-	-	-	-	-	-	8,6
	Autres	-	-	-	-	-	-	2,0	-	3,5

<sup>(a)</sup> C4 – acide butyrique ; C6 – acide hexanoïque ; C8 – acide caprylique ; C10 – acide caprique

<sup>(b)</sup> Acides gras saturés à chaîne longue, tels que C20 – acide arachidique ; C22 – acide béhénique ; C24 – acide lignocérique

## 3.2 Système d'incorporation des acides gras exogènes

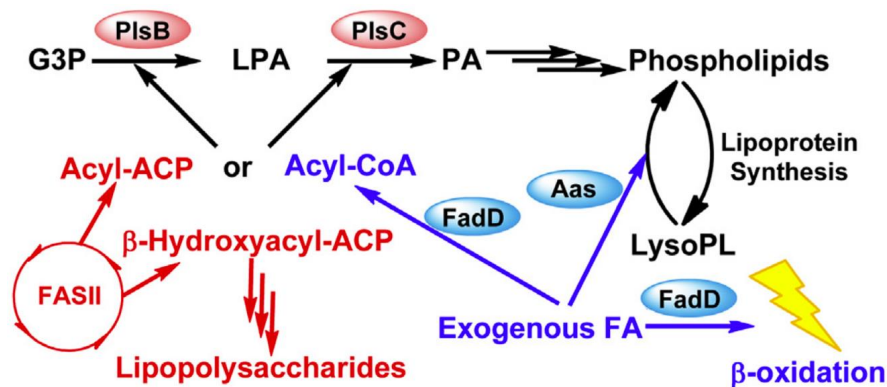
Plusieurs études ont montré que les bactéries étaient capables d'utiliser les acides gras présents dans leur environnement et les incorporer dans leur membrane bactérienne (Ando et al., 1992; de Sarrau et al., 2013; Touche et al., 2023). Trois mécanismes qui dépendent de la classe bactérienne sont décrits dans la littérature.

### 3.2.1 Chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, deux mécanismes sont décrits : l'acyl-CoA synthétase et l'acyl-ACP synthétase. Les deux systèmes font partie de la même famille structurale. Certaines bactéries possèdent les deux mécanismes.

Chez *E. coli*, qui possède les deux systèmes, l'acyl-CoA synthétase a été le premier à être découvert (Black et al., 1992) (Figure 3-1). L'acyl-CoA synthétase, aussi nommé FadD, catalyse la formation d'acyl-CoA à partir des acides gras exogènes (Black et al., 1992). L'acyl-CoA produit est ensuite pris en charge par le système des acyl-transférases PlsB/PlsC pour synthétiser de l'acide phosphatidique (PA) à partir du glycérol-3-phosphate (G3P). D'autre part, l'acyl-CoA peut rejoindre la voie de  $\beta$ -oxydation des acides gras pour générer de l'acétyl-CoA (Yao and Rock, 2017). Une acyl-CoA synthétase à chaîne courte, nommée FadK, est également présente chez cette bactérie (Morgan-Kiss and Cronan, 2004). Cette enzyme permet également la conversion des acides gras exogènes en acyl-CoA, mais seulement dans des conditions spécifiques (condition d'anaérobiose et présence de fumarate comme accepteur final d'électrons) (Morgan-Kiss and Cronan, 2004). Néanmoins, l'acyl-CoA généré par FadK a une chaîne carbonée courte et ne rejoint pas de synthèse du PA *via* PlsB/PlsC (Morgan-Kiss and Cronan, 2004). Chez *E. coli*, les acides gras exogènes peuvent également être pris en charge par la 2-acylglycérophosphoéthanolamine acyltransférase (Aas), une enzyme bi-fonctionnelle composée du domaine de l'acyl-ACP synthétase et du domaine catalysant l'acylation des lyso-phospholipides générés par la synthèse des lipoprotéines (Ray and Cronan, 1976; Jackowski et al., 1994). Ce second mécanisme n'est utilisé que pour le recyclage des lyso-phospholipides, c'est le premier

mécanisme, la voie FadD, qui permet majoritairement l'incorporation des acides gras exogènes dans les phospholipides par le module PlsB-PlsC (Yao and Rock, 2017). La FASII de *E. coli* produit également du  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP pour la biosynthèse des lipopolysaccharides (Parsons and Rock, 2013). À ce jour, aucun mécanisme permettant la conversion des acides gras exogènes en  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP n'a été mis en évidence. Yao et Rock. (2017) suggèrent que l'acyl-CoA généré par FadK rejoint la voie de biosynthèse des lipopolysaccharides (Figure 3-1).



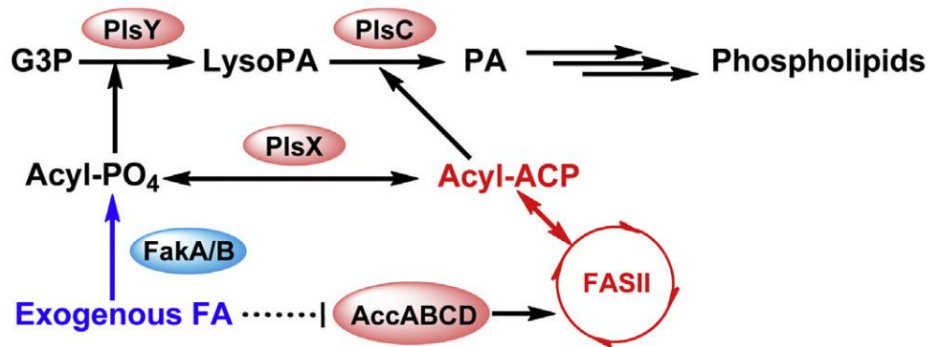
**Figure 3-1.** Système d'incorporation des acides gras exogène chez *Escherichia coli*. La voie PlsB/PlsC permet la synthèse de phospholipides chez les  $\gamma$ -protéobactéries. FASII : voie de biosynthèse des acides gras / G3P : glycérol-3-phosphate / LPA : acide lyso-phosphatidique / PA : acide phosphatidique / LysoPL : lyso-phospholipide / FA : acide gras. Figure de Yao & Rock (2017).

Ando et al. (1991) ont mis en évidence qu'une bactérie marine *Vibrio* sp. était capable de produire une enzyme de type lipase dont l'activité était significativement améliorée lorsque la bactérie était cultivée avec de l'huile d'olive. La lipase permet l'hydrolyse des lipides exogènes complexes en acides gras simples disponibles (Ando et al., 1991). Cette même équipe a également montré que la bactérie était capable d'incorporer les triglycérides présents dans l'huile de sardine dans sa membrane (Ando et al., 1992). En effet, l'action de la lipase a permis de libérer les acides eicosapentaénoïques (EPA) et docosahexaénoïques (DHA) qui ont ensuite été détectés dans les phosphatidyléthanolamine et les phosphatidylglycérol de la membrane (Ando et al., 1992). Chez *Vibrio harveyi*, l'incorporation des acides gras exogènes dans la membrane se fait par une acyl-ACP synthétase, nommée VhAas (Fice et al., 1993). Bien

que ce système soit mal caractérisé chez *Vibrio sp.*, l'expression du gène chez *E. coli* montre que cette enzyme permet une élongation des acides gras exogènes à chaîne moyenne suivie d'une incorporation dans les phospholipides (Jiang et al., 2010). De plus, il a été montré que VhAas accepte un large éventail d'acides gras exogènes, y compris des analogues d'acides gras non naturels qui génèrent les acyl-ACP correspondants (Beld et al., 2014). La faible sélectivité de VhAas suggère que celle-ci jouerait un autre rôle que celui de l'incorporation des acides gras exogènes, comme par exemple la bioluminescence. En effet, la bioluminescence est générée par la conversion de la luciférine (acyl-aldéhyde), du dioxygène (O<sub>2</sub>) et de flavine mononucléotide réduite (FMNH<sub>2</sub>) en eau, flavine mononucléotide (FMN) et acides gras libres (Meighen, 1993). L'acyl-ACP synthétase pourrait être impliquée dans le recyclage de l'acide gras libre généré par la réaction de bioluminescence (Yao and Rock, 2017).

### 3.2.2 Chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, l'incorporation des acides gras exogènes se fait par l'intermédiaire du système Fak, de l'anglais « *fatty acid kinase* » (Yao and Rock, 2017) (Figure 3-2). Ce système, bien décrit chez *S. aureus* et *Streptococcus spp.*, contient une kinase, FakA, capable d'interagir avec différents isoformes de FakB, une protéine de liaison à l'acide gras (Parsons et al., 2014; Shi et al., 2022). L'acide gras exogène, reconnu par FakB, est phosphorylé par FakA afin de former un acyl-PO<sub>4</sub> qui est ensuite pris en charge par le module des acyl-transférases (Yao and Rock, 2017). L'acyl-PO<sub>4</sub> peut être pris en charge, soit par PlsY, pour permettre l'acylation du G3P et la formation du Lyso-PA, puis du PA, soit par PlsX pour être converti en acyl-ACP. Ce dernier peut soit être utilisé directement par PlsC pour être transformé en PA, soit rejoindre le module d'élongation de la FASII si sa longueur de chaîne acyle le permet et si l'espèce bactérienne a la capacité d'élongation (Cf. Chapitre 2 – 2.2.2).



**Figure 3-2.** Système d'incorporation des acides gras exogènes chez les bactéries à Gram positif. La voie PlsX/PlsY/PlsC permet la synthèse de phospholipides. Les acides gras exogènes peuvent inhiber le complexe ACC de la voie de biosynthèse des acides gras endogènes. Cette inhibition est espèce dépendante. FASII : voie de biosynthèse des acides gras / G3P : glycérol-3-phosphate / LPA : acide lyso-phosphatidique / PA : acide phosphatidique / LysoPL : lyso-phospholipide / FA : acide gras. Figure de Yao & Rock (2017).

La protéine kinase FakA est présente sous forme de dimère au sein de la bactérie (Parsons et al., 2014). Une étude approfondie de la structure de FakA chez *Streptococcus suis* a mis en évidence la présence de trois domaines distincts, nommés FakA\_N, FakA\_M et FakA\_C (Shi et al., 2022). Le domaine N-terminal, FakA\_N, s'apparente au domaine DhaL (dihydroxyacétone kinase adénosine diphosphate, sous unité de liaison L) du système DhaK-DhaL de *E. coli*. Chez cette bactérie, DhaL se lie à l'adénosine di-phosphate (ADP) et au Mg<sup>2+</sup> (Shi et al., 2011). De par sa similitude structurale avec le domaine DhaL, le domaine FakA\_N semble servir à la fixation de l'ATP (ATP-binding subunit) (Shi et al., 2022). Le domaine central FakA\_M serait une protéine métallo-chaperonne présentant un motif en doigt de zinc (*zinc finger*) permettant le maintien de la dimérisation de la protéine (Shi et al., 2022). Enfin, le domaine C-terminal, FakA\_C, est un domaine de la famille des protéines DegV. Cette famille regroupe les protéines capables de se lier à un acide gras. Le domaine FakA\_C permet la fixation de l'acyl grâce à la présence de résidus lysine (Shi et al., 2022). Cette analyse structurale de FakA suggère que la dimérisation de FakA permet la formation d'un canal de chargement du substrat, ici l'acide gras exogène, vers le site de fixation de FakB (Shi et al., 2022). L'étude de Subramanian et al. (2022) réalisée chez *S. aureus* confirme la présence de trois domaines et la dimérisation de FakA. L'absence du gène



*fakA* chez *S. aureus* montre que, sans supplémentation en acide gras, aucun changement dans les phospholipides membranaires n'a été observé chez le mutant  $\Delta$ *fakA* par rapport à la souche sauvage (DeMars et al., 2020). En revanche, lors d'une supplémentation en acide oléique, cet acide gras est rentré dans la composition des phospholipides de la souche sauvage entraînant une augmentation de la fluidité et de l'intégrité membranaire. Ce phénomène n'est pas retrouvé chez la souche mutante  $\Delta$ *fakA* (DeMars et al., 2020). Ces résultats montrent que FakA est impliquée dans l'insertion des acides exogènes dans les chaînes acyles des phospholipides (DeMars et al., 2020).

Tout comme le domaine FakA\_C, les protéines FakB sont membres de la famille des protéines DegV (Parsons et al., 2014). Néanmoins, la fixation de la chaîne acyle sur la protéine FakB est ici permise non pas par des résidus lysine mais par des résidus arginine (Shi et al., 2022). Au sein des différents genres bactériens, les protéines FakB sont multiples : deux FakB ont été identifiés chez *S. aureus*, trois chez *S. pneumoniae* et quatre chez *S. pyogenes*, *S. suis*, *E. faecalis* et *E. faecium* (Parsons et al., 2014; Gullett et al., 2019; Zou et al., 2022). De plus, selon le genre bactérien, l'affinité pour la nature de l'acide gras diffère. En effet, chez *S. aureus*, FakB1 et FakB2 sont spécifiques des AGS et des AGI, respectivement (Parsons et al., 2014). Chez *S. pneumoniae*, FakB1, FakB2 et FakB3 sont spécifiques des AGS (C14:0 à C17:0), des AGMI (C18:1w9) et des AGPI (C18:2w6), respectivement (Gullett et al., 2019). Chez *S. pyogenes*, une FakB4 a été mise en évidence, dont le gène est co-régulé avec les gènes du FASII (Lambert et al., 2023). La délétion du gène *fakB4* n'avait aucun impact sur la composition des phospholipides membranaires de la bactérie, mais engendrait une augmentation de la production de lipides et de vésicules membranaires extracellulaires (Lambert et al., 2023). Cette protéine FakB4 semble être impliquée dans la liaison des acides gras produits par la voie endogène et limiterait leur libération extracellulaire chez *S. pyogenes* (Lambert et al., 2023). Chez *S. suis*, FakB4 présente des similarités avec les trois autres FakB, mais son rôle n'a pas pu être étudiée par des approches biochimiques, car celle-ci formait des corps d'inclusion empêchant sa purification (Shi et al., 2022). Les recherches sont à

poursuivre afin de comprendre le rôle et la structure de cette protéine FakB4, notamment en présence d'acides gras exogènes. Chez les entérocoques, les protéines FakB1, FakB2 et FakB4 sont présentes, ainsi qu'une protéine nouvellement identifiée et nommée FakB5 (Zou et al., 2022).

### 3.3 Comportement des bactéries face aux acides gras exogènes

#### 3.3.1 Effet antimicrobien des acides gras exogènes

Depuis plusieurs années, les propriétés antimicrobiennes des acides gras sont rapportées dans la littérature (Kabara et al., 1972; Churchward et al., 2018). Le besoin d'antimicrobiens naturels ou reconnus comme sûr pour la santé (GRAS pour *Generally Recognized As Safe*) est de plus en plus nécessaire en lien avec les préoccupations des consommateurs concernant les risques potentiels liés aux additifs de synthèse (Dutoit et al., 2024). Ainsi, l'idée d'utiliser les acides gras naturellement présents dans les aliments pour leurs propriétés antimicrobiennes est de plus en plus explorée.

Lorsque *L. monocytogenes* est cultivée dans un bouillon BHI à pH 5 à 37°C, les acides gras C12:0, C18:2, C18:2 conjugué (isomère du C18:2, position de la seconde double liaison différente), C18:3 et la monolaurine ont montré une activité inhibitrice à partir de 10, 50, 100, 20 et 10 µg/mL, respectivement (Wang and Johnson, 1992). Au contraire, dans les mêmes conditions, les acides gras C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, le monostéarate de glycérol et le monopalmitate de glycérol n'ont montré aucune action, même à forte concentration (200 µg/mL) (Wang and Johnson, 1992). De la même manière, les acides gras C12:0, C18:2 et C18:3 ont inhibé la croissance de *B. cereus* à 35°C (Ababouch et al., 1994). En revanche, chez *E. faecalis*, à 37°C, le C14:0, C16:0 et C18:0 ont impacté négativement la croissance de la bactérie, alors que le C12:0 ou C20:0 n'avaient aucun impact (Saito et al., 2018).

L'exploration de l'action des acides gras antimicrobiens sur le FASII de *S. aureus* à 37°C a montré que le C18:2, tout comme le C16:1, C18:1, C18:3 et C20:4 (concentration de 25 à 73 µM), inhibaient l'activité de l'enzyme FabI de la voie de

biosynthèse des acides gras à l'inverse des AGS (C16:0 et C18:0) qui n'ont eu aucun effet (Zheng et al., 2005). Les AGI sous forme d'esters de méthyl n'ont également pas eu d'impact sur l'activité de FabI, ce qui montre que la structure de l'AGI a un rôle important dans le mécanisme d'inhibition (Zheng et al., 2005). L'étude de ce mécanisme d'inhibition a montré que le C18:2 se liait soit à l'enzyme FabI, ce qui empêcherait la liaison de l'enzyme avec le cofacteur NADPH, soit au complexe enzyme-NADPH, ce qui empêcherait sa liaison au substrat. (Zheng et al., 2005)

Chez les bactéries capables de former des spores, telles que *B. subtilis*, *B. cereus* ou *Clostridium difficile*, les acides gras exogènes peuvent agir à deux niveaux : (1) la croissance en ralentissant le développement bactérien quand la bactérie est sous forme végétative et (2) sur la germination des spores (Diomandé et al., 2015). La présence de C12:0 ou C18:1 inhibe totalement la germination des spores de *B. cereus* (Ababouch et al., 1994). Le processus de germination est rétabli après retrait des acides gras dans le milieu. Les auteurs ont fait l'hypothèse que les acides gras se lieraient aux sites de germination entraînant ainsi l'inhibition du processus.

Bien que les acides gras saturés aient des effets différents à une température optimale de croissance, ceux-ci ont un effet inhibiteur à basse température. En effet, la monolaurine présente des activités bactériostatiques sur *L. monocytogenes* lors d'une culture à 4°C dans du lait écrémé (Wang and Johnson, 1992). De manière similaire, la croissance de la bactérie est inhibée par la présence d'acides gras saturés (C14:0 ou C16:0) à basse température (5°C) (Flegler et al., 2022; Touche et al., 2023).

### 3.3.2 Effets positifs des acides gras exogènes

Plusieurs études plutôt récentes ont montré que la présence d'acides gras dans le milieu extracellulaire peut également avoir un impact positif sur le comportement bactérien.

#### 3.3.2.1 Contournement de l'action des antimicrobiens visant la FASII

La résistance croissante aux antibiotiques conduit à un besoin urgent de

développer des nouveaux types de traitements antimicrobiens. La FASII étant considérée comme une voie essentielle, des antimicrobiens visant cette voie de biosynthèse se sont développés ces dernières années (Zhang et al., 2006; Foster, 2017). Le mécanisme d'action de ces antimicrobiens est basé sur le blocage de la biosynthèse des acides gras membranaires, ce qui empêche la formation de la membrane, ce qui perturbe la division cellulaire et donc la croissance des cellules bactériennes (Zhang and Rock, 2008; Parsons and Rock, 2011). Parmi les enzymes de la FASII, FabI est l'une des plus exploitées pour le développement d'antimicrobiens, dont le premier inhibiteur décrit est le triclosan (Yao et al., 2016).

Le système Fak des bactéries de l'ordre des Lactobacillales, telles que *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Clostridia*, leur permet de contourner l'inhibition de la synthèse endogène des acides gras par une incorporation des acides gras exogènes présents dans le sérum humain (Yao and Rock, 2017). Par exemple, *Streptococcus agalactiae* est capable de se développer dans des conditions *in vitro* et *in vivo* même si des délétions dans ses gènes de FASII sont présentes (Brinster et al., 2009). De plus, l'ajout dans le milieu extracellulaire d'acides gras sériques humains provoque un arrêt de la biosynthèse des acides gras endogène (Brinster et al., 2009). La membrane est alors quasi-exclusivement constituée des acides gras qui ont été incorporés (Brinster et al., 2009). Ainsi, les inhibiteurs du FASII sont inefficaces pour traiter les infections à *S. agalactiae*. Néanmoins, ce mécanisme n'est pas toujours valable chez les bactéries à Gram positif. Balemans et al. (2010) ont montré, par l'utilisation d'un ARN antisens de FabI inducible par la tétracycline, que *S. aureus* n'était pas capable d'utiliser les acides gras exogènes pour contourner l'inhibition de FabI. Au contraire, leur étude a montré que les acides gras exogènes, notamment le C18:2w6 permettaient aux agents antimicrobiens d'atteindre plus efficacement leur cible (Balemans et al., 2010). Les différences de comportement entre ces deux bactéries pourraient provenir de la différence de régulation de la voie de biosynthèse des acides gras (FabT chez les Lactobacillales et FapR chez les Bacillales) (cf Chapitre 2). À l'inverse, il a été montré que *S. aureus* pouvait devenir résistant aux agents inhibiteurs du FASII

en utilisant des acides gras présents dans son environnement suite à des mutations ponctuelles dans le gène *fabD* (Morvan et al., 2016). Néanmoins, le mutant *fabD* a été sélectionné après une culture de la bactérie en présence de triclosan, donc il est possible que d'autres mutations soient survenues entraînant ce phénotype. Les recherches quant à la possibilité de *S. aureus* de contourner la FASII et l'impact sur la virulence sont toujours en cours.

L'impact des acides gras exogènes a été étudié sur la capacité de tolérance de *E. faecalis* à la céruléine et à la daptomycine (Saito et al., 2018). La céruléine est un inhibiteur du complexe ACC de la FASII, et la daptomycine est un antibiotique actif chez les bactéries à Gram positif qui entraîne une dépolarisation rapide de la membrane et une inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN et protéique. Tous les AGI exogènes, qu'ils soient normalement produits par *E. faecalis* ou présents dans la bile ou le sérum, ont permis de restaurer la croissance bactérienne en présence de céruléine. En revanche, seuls les AGI C18:1 et C18:2 ont permis une protection vis-à-vis de la daptomycine (Saito et al., 2018).

### 3.3.2.2 Effet promoteur des AGI à basse température

Plusieurs études ont montré que la présence dans le milieu extracellulaire d'acides gras insaturés avait un effet positif sur la croissance bactérienne à basse température.

Lorsque *Lactobacillus casei* est cultivée dans un milieu composé d'extrait de cheddar supplémenté avec du Tween 80 contenant de l'acide oléique, sa densité cellulaire de fin de croissance à 8°C est significativement supérieure par rapport à un au contrôle ou à un autre type de supplémentation (Tan et al., 2012). De la même manière, alors qu'une température de 15°C entraîne une diminution de la densité maximale de *B. cereus*, l'ajout d'épinards cuits a permis de restaurer une densité maximale similaire à celle obtenue avec une température optimale (de Sarrau et al., 2013). Les auteurs ont montré que la fraction lipidique extrait des épinards était riche en AGI à bas point de fusion, en particulier en acide linoléique (C18:3) (plus de 40% des

AGI totaux) (de Sarrau et al., 2013).

Chez *L. monocytogenes*, deux études publiées à six mois d'intervalle, ont démontré l'impact des AGI sur la croissance de cette bactérie à basse température. Touche et al. (2023) ont mis en évidence qu'une supplémentation en acide oléique (C18:1) dans du milieu TSB (*Tryptone Soya Broth*) favorisait la croissance de neuf souches de *L. monocytogenes* à 8°C. La souche Lm208 est celle dont le taux de croissance a montré la plus forte augmentation en présence de C18:1. Cette souche a également montré une plus forte croissance en présence d'autres AGI dont l'acide linoléique C18:2 et l'acide  $\gamma$ -linoléique (GLA, C18:3n6) à 5°C mais pas à 37°C (Touche et al., 2023). Flegler et al. (2022) ont également montré que l'ajout de Polysorbate 80 (contenant du C18 :1) a permis l'augmentation de la croissance de *L. monocytogenes* à 6°C. Il est à noter qu'une première étude parue en 2018 avait déjà mis en évidence une augmentation du taux de croissance maximum de la bactérie à 4°C dans un modèle d'émulsion, sans que les auteurs ne sachent en expliquer la cause (Verheyen et al., 2018). Il est probable que l'huile végétale contenue dans l'émulsion ait libéré des acides gras insaturés utilisables par la bactérie. Des simulations de la croissance de *L. monocytogenes* en présence d'acides gras exogènes à basse température ont été effectuées afin de se mettre dans des conditions de prévision d'une durée de vie d'un aliment (Touche et al., 2023). Cette étude a montré que, en présence d'AGI, la limite réglementaire de 100 UFC/g était atteinte deux jours avant un milieu non supplémenté (Règlement EC 2073/2005) (CE, 2005).

Dans toutes ces études, l'ajout d'AGI induit, en parallèle de l'augmentation de la croissance, une incorporation de l'AGI ajouté dans la membrane bactérienne. En présence d'extraits d'épinard, la membrane de *B. cereus* a montré une augmentation de la proportion des AGI, notamment le C18:3 avec une augmentation de 40% après l'ajout contre 0,05% sans ajout (le C18:3 étant l'acide gras présent dans les extraits d'épinards). De manière similaire, *L. monocytogenes* a incorporé les AGI ajoutés au milieu extracellulaire dans sa membrane, et ceci de manière bien plus importante à 5°C

qu'à 37°C (Flegler et al., 2022; Touche et al., 2023). La biosynthèse des acides gras membranaires étant un processus gourmand en énergie et en métabolites, l'incorporation pourrait être un avantage énergétique. En effet, la synthèse d'un acide gras de 16 atomes de carbone (palmitoyl-CoA) requiert 8 molécules d'acétyl-CoA, 14 NADPH et l'hydrolyse de 7 molécules d'ATP (Yao and Rock, 2017). Il est intéressant de noter que ces études ont également montré que les acides gras exogènes sont incorporés quelle que soit leur nature, saturés ou insaturés. Néanmoins, seuls les AGI favorisent la croissance. En effet, l'incorporation des AGI provoque une augmentation de la fluidité membranaire, alors que des AGS rigidifient la membrane. À basse température, l'incorporation d'AGI permet de restaurer une fluidité optimale compatible avec la croissance, alors que l'incorporation d'AGS amplifie la rigidité induite par la température, ce qui nuit encore plus à la croissance.

### 3.3.2.3 Effet des AGI sur la formation de biofilms

Comme mentionné dans le Chapitre 1, un biofilm est une communauté de micro-organismes évoluant dans une matrice extracellulaire. Au sein des biofilms, les acides gras sont reconnus comme étant des molécules de communication cellulaire (*quorum sensing*) (Davies and Marques, 2009). Des études récentes ont montré un lien entre le métabolisme des acides gras et la formation de biofilm.

D'une part, un mutant par insertion de transposon dans le gène *fakA* chez *S. aureus* présentait une formation de biofilm entre 1,9 et 4,6 fois plus importante que la souche sauvage (Sabirova et al., 2015). La complémentation de la souche mutante avec le gène *fakA* de la souche sauvage a confirmé que seul le gène *fakA* était responsable du changement de la production de biofilm (Sabirova et al., 2015). Cette expérience montre un lien moléculaire entre la formation de biofilm et le système d'incorporation des acides gras exogènes. Des investigations doivent être menés afin d'élucider le lien entre ces deux processus.

D'autre part, *P. aeruginosa* incorpore dans ses phospholipides membranaires (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylglycérol), les acides gras poly-insaturés

(C18:2, C18:3w3, C18:3w6, C20:3, C20:4 et C20:5), présents dans le milieu extracellulaire (Baker et al., 2018). L'incorporation de ces acides gras (à l'exception du C20:3) provoque une augmentation de la perméabilité membranaire et une augmentation de la formation de biofilm sur du plastique. De plus, ce phénomène s'amplifie lorsque le pH diminue. Ces résultats démontrent également un lien entre les acides gras insaturés exogènes et la capacité de formation de biofilm.

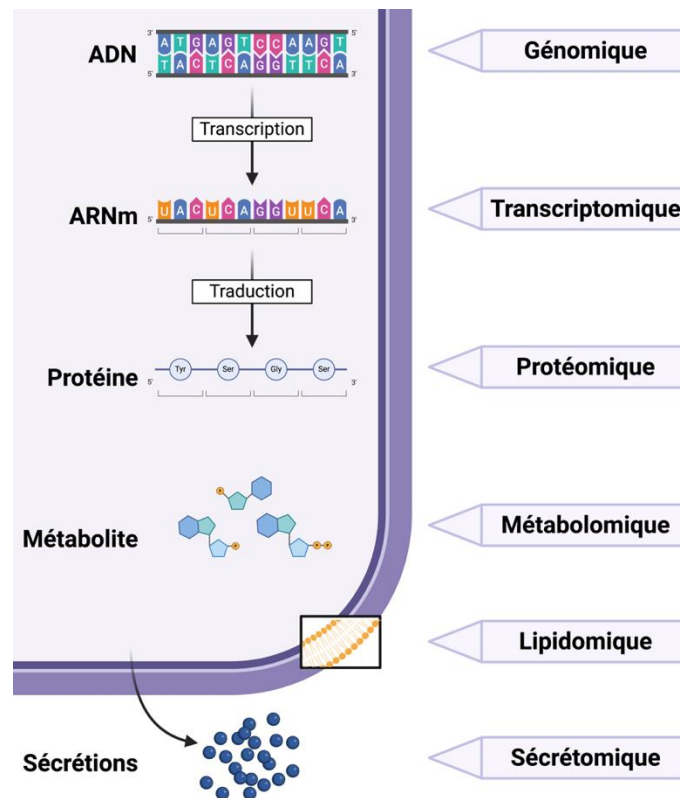


# **CHAPITRE 4**

## **Exploration du génome et du transcriptome**

Les avancées technologiques des dernières décennies, telles que le séquençage, ont bouleversé la biologie par l'introduction de nouvelles approches connues sous le terme générique de « méthodes omiques » (Dai and Shen, 2022). Le terme « ome » fait référence à un ensemble complet d'une entité : génome (ensemble des gènes d'une cellule), transcriptome (ensemble des transcrits d'une cellule), protéome (ensemble des protéines d'une cellule). D'autres déclinaisons émergent depuis quelques années telles que le surfaçome (ensemble des protéines de surface d'une cellule), le métabolome (ensemble des métabolites d'une cellule), le volatilome ou encore lipidome... Par conséquent, le terme « omique » fait référence à l'étude approfondie d'un « ome » (Abdelkader et al., 2023) (Figure 4-1). À l'échelle des cellules bactériennes, ces approches ont permis des découvertes majeures dans la compréhension de leur physiologie, de leurs interactions avec leur hôte ou encore leur rôle dans divers environnements (Kang et al., 2019; Janiszewska et al., 2022). Les méthodes omiques reposent sur un même flux de travail, à savoir la conception expérimentale, la préparation des échantillons, l'extraction des molécules à analyser, l'analyse moléculaire, le traitement des données par bioinformatique et la validation des résultats obtenus (Abdelkader et al., 2023).

Nous nous concentrerons ici sur la génomique et la transcriptomique, les deux méthodes utilisées dans ce travail de thèse.



**Figure 4-1.** Représentation des principales méthodes « omiques » à l'échelle d'une cellule. Figure créée avec BioRender.com

## 4.1 La génomique

### 4.1.1 Généralités

La génomique est l'étude complète des gènes (génome) d'un organisme en passant par une étude de leur fonction, de leur structure et de leurs interactions (Arivaradarajan and Misra, 2018). L'étude du génome est généralement réalisée en amont de toute autre analyse omique, car celle-ci facilite l'analyse des données de la transcriptomique ou de protéomique (Singh and Datta, 2018). De plus, la génomique peut être subdivisée en plusieurs branches dont les principales sont la génomique structurale (étude du contenu et de l'organisation de l'information des gènes), la génomique fonctionnelle (étude de la fonction biologique des gènes et de leurs produits) et la génomique comparative (étude de la relation entre la structure et la fonction des gènes de différentes espèces) (Liu, 2024). Les autres branches mènent à des études sans la nécessité d'avoir la séquence complète du génome, telles que la

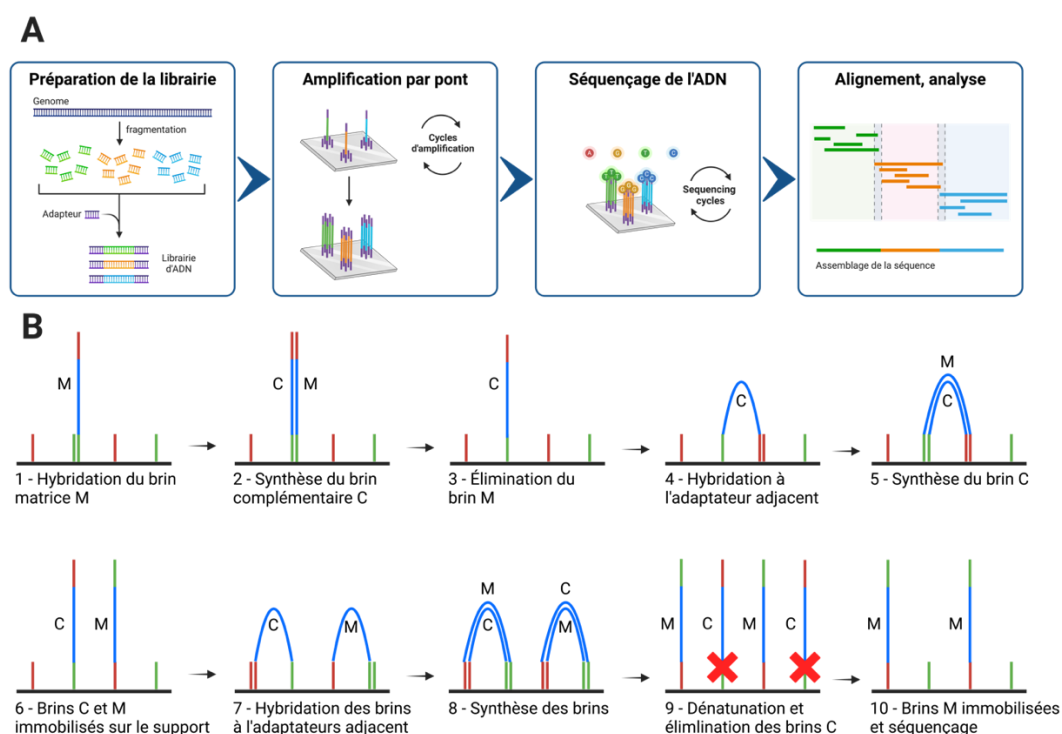
génomique des populations (comparaison à grande échelle des séquences d'ADN de la population via l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques) ou la génomique environnementale (identification des changements génomiques des populations en lien avec des facteurs environnementaux) (Liu, 2024).

La génomique permet de répondre à de nombreuses questions sur l'organisme et ses interactions avec son environnement et peut-être appliquée dans divers domaines comme la médecine, l'écologie, l'agriculture ou les biotechnologies (Liu, 2024). À l'échelle des microorganismes, la génomique permet de découvrir de nouvelles espèces et de comprendre leur évolution, de comprendre le phénomène de résistance aux antibiotiques et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques ou encore d'identifier les facteurs de virulence (Schardt, 2018; Janiszewska et al., 2022; Liu, 2024). Par exemple, appliqué à *Listeria*, le développement de la méthode WGS a permis de mettre en évidence deux nouvelles espèces, *L. kieliensis* et *L. swaminthanii*, isolée respectivement dans les eaux usées et le sol (Cf. Chapitre 1 – Tableau 1-1) (Schardt, 2018; Carlin et al., 2022).

#### 4.1.2 Séquençage de L'ADN

Quelle que soit la branche d'étude génomique choisie, cette méthode implique une étape d'extraction de l'ADN et son séquençage. Le séquençage de l'ADN a débuté dans les années 70 avec le développement de la méthode Sanger (Sanger et al., 1977). Par la suite, de nouvelles méthodes, les séquençages de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*, NGS) : la seconde génération avec le séquençage Illumina®, le pyroséquençage, le séquençage SOLiD et Ion Torrent, la troisième génération avec le séquençage PacBio et Oxford Nanopore, et enfin la quatrième génération toujours en cours de développement (Slatko et al., 2018). Le développement de ces NGS ont permis une réduction des coûts, de la difficulté de la technique et de la durée du processus par un séquençage simultané de plusieurs séquences (Singh and Datta, 2018).

Quelle que soit la technologie utilisée, le séquençage d'un génome entier comprend trois étapes : (1) l'extraction de l'ADN, (2) la préparation de la banque ou *library* de séquençage, et (3) et le séquençage lui-même (Liu, 2024). Il est impossible d'obtenir une séquence continue, c'est pourquoi la quatrième génération de séquençage est en cours de développement, leur but étant de pouvoir séquencer de longs fragments d'ADN (Slatko et al., 2018). Aujourd'hui, la technologie la plus utilisée est la technologie Illumina®, basée sur la méthode d'amplification par pont sur un support solide (Hu et al., 2021). Les erreurs sont principalement des erreurs de substitutions et très rarement des erreurs d'insertions ou de délétions et sont associées à un bas taux d'erreur (0,1%). (Hu et al., 2021). La technologie de séquençage Illumina® se base sur le séquençage par synthèse (SBS, *sequencing by synthesis*) et se déroule selon les cinq étapes suivantes : préparation des échantillons, amplification par pont, séquençage par synthèse, alignement des séquences et analyse des données (Figure 4-2.A) (Illumina, 2023).



**Figure 4-2.** Principe du séquençage par la technologie Illumina®. (A) De la préparation de la banque à l'alignement des séquences obtenues. (B) Représentation schématique du processus d'amplification par pont. Le support de la réaction (*Flow Cell*) est représenté par le trait noir. Les adaptateurs sont représentés en rouge et vert. « M » correspond au brin matrice et « C » au brin complémentaire. Figure créée par BioRender.com, d'après Van Dijk and Themes (2021).

Après fragmentation, des adaptateurs sont ajoutés aux fragments d'ADN aux deux extrémités (en rouge et vert sur la Figure 4-2.B). Ces adaptateurs complémentaires aux séquences fixées au support solide, nommé *Flow Cell*, permettent la fixation par hybridation des fragments à séquencer et sont le site d'initiation de l'amplification par pont (ou PCR en pont ou *bridge* PCR (bPCR)) (Slatko et al., 2018). Une fois hybridés sur le support, les fragments d'ADN simple brin servent de matrice et sont amplifiés par une polymérase. Après dénaturation et lavage, les brins d'ADN matrices sont éliminés tandis que les brins d'ADN nouvellement synthétisés sont immobilisés sur le support par le biais de l'adaptateur. L'amplification par pont commence. Les trois étapes classiques de la PCR s'enchainent. Lors de l'hybridation, le brin d'ADN immobilisé se plie et s'hybride à l'adaptateur complémentaire adjacent, ce qui forme un pont, puis son brin complémentaire est amplifié par polymérisation. L'étape de dénaturation permet la séparation des deux brins d'ADN qui pourront ensuite s'hybrider à une autre séquence adaptatrice. Ces étapes sont répétées plusieurs fois. À l'issue de la dernière étape d'amplification, seuls les brins identiques au brin d'origine sont conservés par clivage pour les étapes de séquençage (Van Dijk and Thermes, 2021; Illumina, 2023). Le séquençage est basé sur la lecture de l'incorporation des nucléotides, chacun marqué par un fluorochrome d'une couleur différente. Les nucléotides sont ajoutés à chaque cycle de séquençage. Lorsque le nucléotide complémentaire à celui du brin d'ADN est incorporé, alors le fluorochrome est clivé par l'action de l'ADN polymérase et émet un signal fluorescent (Van Dijk and Thermes, 2021). Le signal de fluorescence est caractéristique du nucléotide incorporé, et permet donc de connaître la séquence du brin d'ADN. Certaines plateformes de séquençage Illumina® sont capables d'effectuer un séquençage par paire. Il s'agit d'un séquençage qui se produit aux deux extrémités d'un fragment d'ADN, ce qui génère des données de séquence de haute qualité. (Hu et al., 2021). Les séquences nucléotidiques obtenues par le séquençage sont appelées *reads*.

### 4.1.3 Analyse des données de séquençage

Le pré-traitement des données brutes est scindé en trois étapes : le démultiplexage (*demultiplexing*), la suppression des adaptateurs (*trimming*), et le contrôle de la qualité (Liu, 2024). Le démultiplexage consiste à séparer les *reads* des différents échantillons qui ont été séquencés simultanément (sur la même cellule *Flow Cell*). La suppression des adaptateurs consiste à retirer les séquences adaptatrices qui ont servi pour l'amplification de la banque d'ADNc et le séquençage. Le contrôle de la qualité permet de filtrer et d'évaluer la qualité des données brutes. En effet, des variabilités peuvent survenir tout au long du processus de séquençage (erreur d'amplification, contamination, erreur de séquençage). Le contrôle de la qualité permet de détecter ces biais par l'intermédiaire d'un calcul d'un score de qualité (Head et al., 2014; Deshpande et al., 2023). Le score Phred un bon indicateur de la qualité de séquençage, il permet le calcul de la probabilité qu'une base soit fautive (mauvaise incorporation). Dans le cas d'un séquençage Illumina®, ce score se situe généralement entre 35 et 40. Plus ce score est élevé, meilleure est la qualité, par exemple, un score de 30 correspond à un pourcentage d'erreur de 0.1%, soit 99,9% de chance que les bases incorporées soient correctes (Guo et al., 2014). L'attribution du score est spécifique à l'organisme et à l'expérience (en général, le score choisi est de 30 pour les génomes bactériens), mais il est conseillé d'éliminer les valeurs aberrantes (Conesa et al., 2016).

Ensuite, les *reads* sont alignées à une séquence nucléotidique de référence (*mapping*), le plus souvent le génome connu d'une espèce bactérienne ou d'une souche de référence (Brown, 2002). Cet alignement permet également de vérifier le taux de couverture (*coverage*), c'est-à-dire la longueur totale des fragments d'ADN séquencés par rapport au génome de référence (Deshpande et al., 2023). Le séquençage par paire permet de réduire les possibles erreurs lors de l'alignement des séquences (Hu et al., 2021). Une annotation du génome est réalisée afin de connaître l'ensemble des caractéristiques du génome séquencé : nombre de gènes totaux avec

le nombre de gènes codant des protéines (CDS, *coding sequence*), les longueurs et les fonctions de chaque gène... De nombreux outils d'annotation automatique des génomes sont disponibles, comme l'outil Prokka (*rapid prokaryotic genome annotation*) couramment utilisé pour l'annotation des génomes bactériens (Seemann, 2014). De plus, à l'aide des bases de données disponibles, telles que NCBI, ListiWiki (base de données pour *L. monocytogenes*) ou SubtiWiki (base de données pour *B. subtilis*), l'annotation automatique peut être enrichie et d'identifier les gènes n'ayant pas été annoté automatiquement (Pedreira et al., 2022; Elfmann et al., 2023).

## 4.2 La transcriptomique

### 4.2.1 Généralités

La transcriptomique consiste en l'analyse de l'ensemble des ARN transcrits à un instant t dans une cellule, et donne ainsi des informations sur les niveaux d'expression de chaque gène (Arivaradarajan and Misra, 2018). La variation du transcriptome peut être observée au fil du temps entre les différents types de cellules et en fonction des conditions environnementales (Arivaradarajan and Misra, 2018).

L'étude du transcriptome a de multiples applications aussi bien dans le domaine médical pour le diagnostic d'une maladie, que dans le domaine de recherche pour l'étude d'agents pathogène (Liu, 2024). Appliquées au domaine de la microbiologie, les approches de transcriptomique peuvent révéler les mécanismes d'adaptation mis en place par une bactérie en réponse à divers stress environnementaux (température, pH), mais également en présence d'antibiotiques. Elles permettent également l'étude des interactions hôte-pathogène ou au sein même d'une communauté microbienne (Dai and Shen, 2022; Janiszewska et al., 2022; Abdelkader et al., 2023). Dans le cadre de ce travail de thèse, l'approche transcriptomique a été utilisée afin d'étudier l'expression des gènes de la souche d'intérêt lors d'un stress froid avec et sans supplémentation en acides gras exogènes dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués.



## 4.2.2 Préparation d'échantillon pour une étude du transcriptome

Toutes les méthodes de transcriptomiques nécessitent une extraction des ARN de l'organisme à étudier (Liu, 2024). Quel que soit l'organisme étudié les techniques d'extraction des ARN sont similaires et impliquent les étapes suivantes : une lyse des cellules, une séparation des phases aqueuse et organique, une précipitation des ARN, des lavages avec séchage, une resuspension, puis un contrôle de la qualité et un dosage de la quantité (Chomczynski and Sacchi, 1987, 2006). Un traitement avec une DNase peut être effectué afin d'éliminer l'ADN génomique (ADNg) contaminant.

Dans une cellule bactérienne, trois catégories d'ARN coexistent : ARNm (ARNmessenger), ARNr (ARN ribosomiaux) et ARNt (ARN de transfert) (Campbell et al., 2012). Ils forment les ARN totaux extraits lors de la première étape de toute analyse d'un transcriptome. Selon le type d'ARN étudié, un enrichissement des ARNm ou une déplétion des ARNr sont possibles (Lowe et al., 2017). La méthode couramment utilisée est le recours à des billes magnétiques recouvertes (i) de séquences nucléotidiques dT qui permettent l'isolement des ARNm chez les eucaryotes grâce à leur queue polyA, ou (ii) ou de sondes nucléotidiques spécifiques marquées (fluorescence, radioactivité, biotine) permettant de cibler des ARN particuliers (Lowe et al., 2017; Liu, 2024).

Les ARN sont des molécules d'acides nucléiques monocaténares (ou simple brin), de ce fait, ils sont instables et facilement dégradés par l'action de RNases (Nowakowski and Tinoco, 1997). Ainsi, l'extraction de ces ARN totaux et leur préservation pendant leur stockage avant analyse sont deux points cruciaux pour la mise en place d'une analyse transcriptomique par RT-qPCR ou RNA-sequencing. Ainsi, la rétro-transcription de l'ARN en ADNc (ADN complémentaire) par l'action d'une transcriptase inverse (ou *reverse transcriptase*, abrégé RT) permet d'obtenir des échantillons stables pouvant subir les étapes ultérieures (Deana and Belasco, 2005; Liu, 2008). À ce jour, différents kits sont disponibles sur le marché dont les performances varient selon différents paramètres. Werbrouck et al. (2007) ont évalué quatre aspects différents de la transcription inverse, soit les enzymes de rétro-transcription, le type

d'amorces, le volume d'ARN à rétro-transcrire et le temps d'incubation, chez *L. monocytogenes*. Leurs résultats n'ont montré aucune différence significative entre les enzymes testées, même lors d'un faible nombre de cellules bactériennes de l'ordre de  $10^5$  cellules (Werbrouck et al., 2007). De plus, l'utilisation d'amorces aléatoires était plus sensible que l'utilisation d'amorces spécifique à la cible, ces dernières entraînant la formation de dimères d'amorce (Werbrouck et al., 2007). Leurs résultats ont également démontré que l'utilisation d'un haut volume d'ARN (au-dessus de 5  $\mu$ L) ne permettait pas d'améliorer la sensibilité de la réaction, contrairement à l'augmentation du temps d'incubation (meilleure sensibilité à 90 min qu'à 15 min) (Werbrouck et al., 2007).

Le contrôle de l'intégrité des ARN est nécessaire pour un séquençage de qualité suffisante, et est généralement mesuré par un BioAnalyzer (Kukurba and Montgomery, 2015). Cet appareil utilise la technique de l'électrophorèse capillaire en micro-fluidique afin de déterminer l'intégrité des ARN par le biais du rapport ARNr16S/ARNr23S (Schroeder et al., 2006). Un algorithme permet également d'attribuer un score d'intégrité de l'ARN, appelé RIN pour *RNA Integrity Number*, compris entre 1 et 10 où 1 correspond à un ARN très dégradé et 10 à un ARN complètement intact (Kukurba and Montgomery, 2015). En général, un ARN avec un RIN inférieur à 6 est considéré de mauvaise qualité et son utilisation n'est pas recommandée pour l'étape ultérieure de séquençage (Kukurba and Montgomery, 2015).

## 4.3 Méthodes d'exploration du transcriptome

### 4.3.1 Quantification d'un fragment d'ARN cible par RT-qPCR

Apparue dans les années 90, la PCR quantitative (qPCR) est basée sur les mêmes étapes que la technique de PCR classique (*Polymerase Chain Reaction*) dont le but est d'amplifier une région d'ADN en un nombre très élevé de copies afin de faciliter son étude et son exploitation (Bartlett and Stirling, 2003). La PCR est une succession de cycles (entre 35 et 45 cycles) composée de trois principales étapes : (1) une phase de

dénaturation de l'ADN double brin, (2) une phase d'hybridation du couple d'amorces et (3) une phase d'élongation ou d'extension des amorces. (Joshi and Deshpande, 2011). La qPCR permet le suivi de la concentration d'ADN au fur et à mesure de son amplification par l'apparition d'une fluorescence par l'intermédiaire d'un fluorochrome (Higuchi et al., 1993). L'intensité de fluorescence qui dépend de la quantité d'ADN dans le milieu réactionnel est mesurée à chaque cycle et exprimée en Unité Relative de Fluorescence (RFU, *Relative Fluorescence Unit*). Il existe une relation de proportionnalité entre la quantité de fluorescence mesurée et la quantité d'ADN amplifié dans l'échantillon (Moinard, 2023).

#### 4.3.1.1 Technologie de quantification

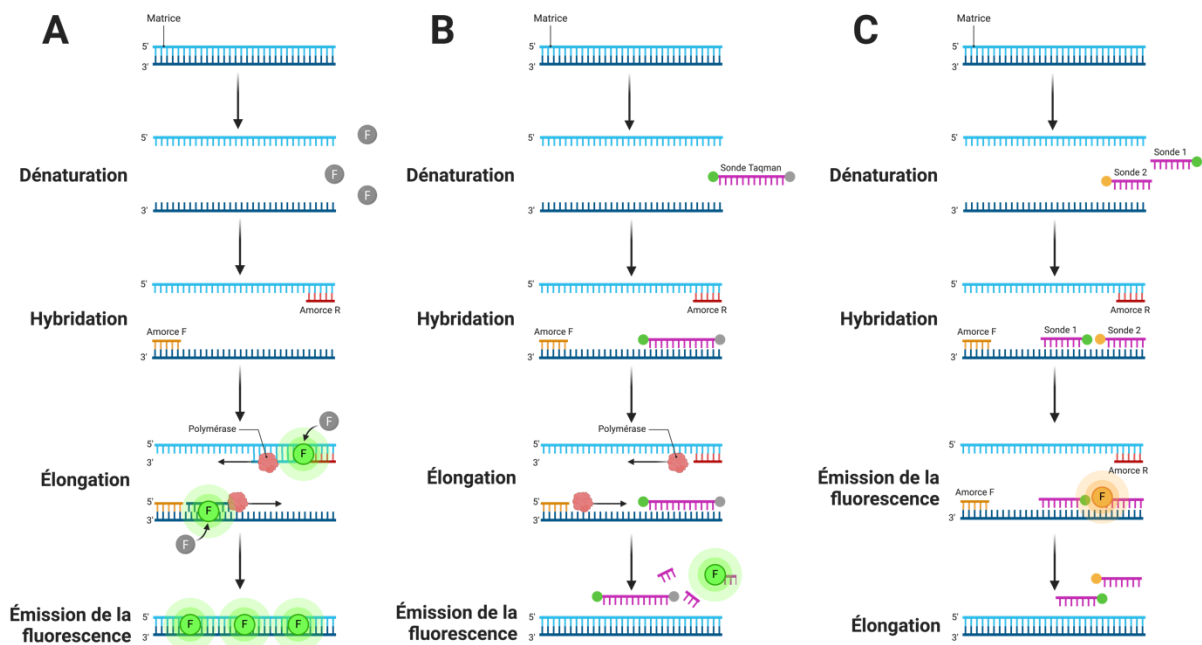
Le suivi de la quantité d'ADN peut se faire soit par l'utilisation de fluorochromes intercalants l'ADN (méthode aspécifique), soit par l'utilisation de sondes complémentaires à la cible amplifiée (méthode spécifique).

Les molécules se liant à l'ADN double brin peuvent être divisé en deux classes : les agents intercalants l'ADN comme le BET, le SYBR®Green et l'EvaGreen® et les agents se fixant sur le sillon mineur de l'ADN comme le Hoeschst (Higuchi et al., 1993; Morrison et al., 1998; Nielsen, 2002; Mao et al., 2007) (Figure 4-3.A.). Quel que soit l'agent utilisé, leur émission de fluorescence augmente lorsque celui-ci est lié à l'ADN double brin (Poitras and Houde, 2002). Lors de l'étape d'élongation, le colorant se lie à l'ADN double brin, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence (Bustin, 2000). Au contraire, lors de l'étape de dénaturation, l'émission de la fluorescence diminue. Par conséquent, la mesure de l'émission de la fluorescence est réalisée à la fin de chaque cycle de PCR, ce qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié (Bustin, 2000). Le SYBR® Green, agent le plus fréquemment utilisé, est une cyanine (marqueur synthétique) asymétrique se liant préférentiellement à l'ADN double brin et parfois sur le sillon mineur (Yue et al., 1997). Le complexe SYBR®Green-ADN absorbe la lumière bleue ( $\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$ ) et émet de la fluorescence verte ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ) (Yue et al., 1997).

Parmi les méthodes de détection spécifique, quatre technologies principales co-existent : l'hydrolyse de sondes (*Taqman*), les balises moléculaires (*Molecular Beacon*), l'hybridation de deux sondes (*HybProbes*), et les amorces scorpion (*scorpion primer*). Chaque technique est abordée brièvement ci-dessous, à l'exception de l'approche *scorpion primer* qui est très peu utilisée à ce jour. Les *Taqman*, et *Molecular Beacon* sont basées sur le *quenching* et sont les plus couramment utilisées (Figure 4-3.B). Bien que leur principe de fonctionnement diffère, les sondes ont, dans les deux technologies, un fluorochrome rapporteur (*reporter*) à leur extrémité 5' dont le spectre d'émission est éteint par un second fluorochrome (*quencher*) à leur extrémité 3' (Bustin, 2000). Ces sondes sont complémentaires et s'hybrident à la région cible ce qui améliore la spécificité de la quantification. Au cours de la phase d'élongation, l'activité 5'-exonucléasique de la polymérase hydrolyse la sonde *Taqman* ce qui libère le *quencher* et permet donc l'émission de la fluorescence du reporter et sa quantification (Bustin, 2000; Poitras and Houde, 2002)(Bustin, 2000). La sonde *Molecular Beacon* forme une structure d'épingle à cheveux dont la boucle est complémentaire à la région d'ADN cible (Tyagi and Kramer, 1996). Lors de la dénaturation, la structure en épingle à cheveux s'ouvre pour permettre son hybridation sur la région d'ADN cible et éloigne le reporter de son quencher qui émet sa fluorescence (Poitras and Houde, 2002). Au cours de la phase d'élongation, la sonde se détache et reprend sa forme initiale en épingle à cheveux, bloquant ainsi l'émission de la fluorescence (Bustin, 2000). La mesure de fluorescence se fait donc à la fin de l'hybridation avant la polymérisation.

La méthode d'hybridation *HybProbes* utilise deux sondes fluorescentes (Figure 4-3.C). Une première sonde contient à son extrémité 3' un fluorochrome donneur et une seconde sonde contient à son extrémité 5' un fluorochrome récepteur (Poitras and Houde, 2002). Lors de la phase d'hybridation, les deux sondes s'hybrident sur la région d'ADN cible. Les deux sondes étant à proximité, la sonde avec le fluorochrome récepteur émet sa fluorescence, ce qui permet la quantification de l'amplification (Bustin, 2000). Lors de la phase d'élongation, de par le passage de la polymérase, les deux sondes se détachent et retournent en solution (Bustin, 2000). Contrairement à la

technique Taqman, les sondes ne sont pas hydrolysées à chaque cycle de qPCR et peuvent donc être remobilisées (Poitras and Houde, 2002). L'utilisation de deux sondes fluorescentes permet une meilleure spécificité du gène cible, ainsi qu'une meilleure détection du signal fluorescent (Wittwer et al., 2013).

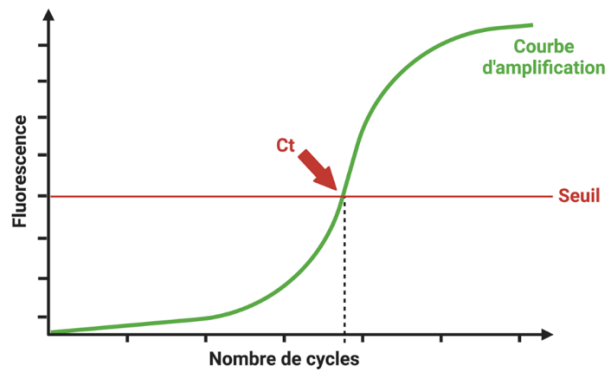


**Figure 4-3.** Technologies de détection de l'expression d'un gène cible par PCR quantitative. (A) Détection aspécifique avec agent fluorescent se liant à l'ADN double brin (SYBR®Green). (B) Détection spécifique par l'utilisation de sondes fluorescentes (exemple des sondes TaqMan). (C) Détection spécifique par l'utilisation de deux sondes fluorescentes (méthode *HypProbes*). Figure créée avec BioRender.com, d'après Bustin (2000) et Poitras and Houde (2002).

#### 4.3.1.2 Notion de cycle seuil

Le cycle seuil ou *threshold cycle* ( $C_T$ ) est un concept essentiel en qPCR et est à la base d'une quantification précise et reproductible (Higuchi et al., 1993). À chaque cycle, la fluorescence est mesurée et représente la quantité de fragment d'ADN cible amplifié. Plus il y a d'ADN cible à amplifier au début de la réaction de qPCR, moins il faudra de cycle d'amplification pour atteindre un niveau de fluorescence au-dessus du bruit de fond (Gibson et al., 1996). Le  $C_T$  correspond donc à l'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne de seuil définie au préalable par le manipulateur et fait référence au nombre de cycles nécessaire pour atteindre cette ligne de seuil (Bustin,

2000) (Figure 4-4). Une valeur de  $C_T$  élevée (au-dessus de 35) signifie une faible présence d'ADN cible et est considérée comme négligeable. Au contraire, une valeur de  $C_T$  basse (environ 10) indique une forte présence d'ADN cible dans l'échantillon de départ (Nolan et al., 2006).



**Figure 4-4.** Représentation schématique d'une courbe d'amplification de PCR quantitative (en vert) où l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. La ligne seuil (en rouge), préalablement définie, permet de déterminer le cycle seuil ( $C_t$ ) qui représente le nombre de cycle nécessaire à la détection du signal de fluorescence.

#### 4.3.1.3 Analyse des données de qPCR

Après l'établissement de la ligne seuil, les valeurs de  $C_t$  obtenues lors de la qPCR peuvent être traduites en résultat quantitatif (Nolan et al., 2006) Deux stratégies de quantification sont possibles : la quantification absolue ou la quantification relative. (Biaassoni and Raso, 2020).

La quantification absolue permet de déterminer la quantité d'ADNc cible d'un échantillon par l'utilisation d'une courbe de quantification, aussi appelée courbe standard ou courbe étalon, obtenue à partir de différentes concentrations connues de la séquence cible (Becker-André and Hahlbrock, 1989; Mitra, 2003). Après avoir tracé la courbe étalon ( $C_T = f(\text{Fluorescence ou Nombre de copies}) = f(\text{Fluorescence})$ ), la pente ( $p$ ) et l'efficacité de la réaction de PCR ( $\epsilon$ ) sont extraits (Bustin, 2000). L'efficacité d'amplification peut varier en fonction des différents facteurs de la PCR (amorces, inhibiteurs, température, épuisement des réactifs), son calcul permet de calculer une concentration d'ADN qui prend en compte les variabilités de la réaction (Nogva and Rudi, 2004).

$$\varepsilon = 10^{-(1/p)}$$

Avec :  $\varepsilon$  l'efficacité d'amplification de la réaction

$p$  pente de la courbe ( $ax + b$ )

La quantification de l'ADN est ensuite définie par l'équation suivante (Liu, 2024) :

$$N_c = N_0 * (1 + \varepsilon)^c$$

Avec :  $N_c$  le nombre de copies d'ADN détectés au bout de  $c$  cycles

$N_0$  le nombre de copies d'ADN au début de la réaction

$\varepsilon$  l'efficacité d'amplification de la réaction

Mise au point en 2001, la méthode de quantification relative ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) est devenue une approche courante en qPCR et permet de comparer les niveaux d'expression d'un gène cible par rapport à un gène de référence dans des conditions différentes ou entre différents échantillons (Livak and Schmittgen, 2001). Le gène de référence est un gène dont l'expression est stable quelle que soit la condition ou la phase de croissance (Biassoni and Raso, 2020). La méthode de Livak utilise un seul gène de référence et suppose que l'efficacité de PCR est de 100%, représentée par une valeur de 2 pour la base de la fonction exponentielle (soit  $\varepsilon = 2$ ) (Livak and Schmittgen, 2001). Les étapes de calcul sont les suivantes :

Étape 1 : calcul de la différence de  $C_T$  entre le gène cible et le gène de référence pour chaque échantillon (par exemple, un échantillon ayant reçu un traitement particulier, témoin pour un échantillon sans traitement)

$$\Delta Ct_{test} = \Delta Ct_{gène\ cible} - \Delta Ct_{gène\ de\ référence}$$

$$\Delta Ct_{témoin} = \Delta Ct_{gène\ cible} - \Delta Ct_{gène\ de\ référence}$$

Étape 2 : normalisation du  $\Delta Ct$  de l'échantillon testé par rapport au  $\Delta Ct$  de l'échantillon témoin

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{test} - \Delta Ct_{témoin}$$

Étape 3 : calcul du rapport d'expression

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Le ratio de la quantification relative permet de déterminer l'expression d'un gène lors d'un traitement particulier de l'échantillon (par exemple, application d'un choc thermique) par rapport à la condition témoin (par exemple, sans application d'un choc thermique). Le ratio est fixé à 1 pour la condition témoin. Lorsque le ratio est supérieur à 1, alors le gène cible est sur-exprimé, à l'inverse, si celui-ci est inférieur à 1, le gène cible est sous-exprimé (Livak and Schmittgen, 2001). Par exemple, si le ratio  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 10$ , alors le gène cible est 10 fois plus sur-exprimé, et réciproquement. Par la suite, la méthode de Livak a été modifiée par le modèle de Pfaffl en prenant en compte l'efficacité de la PCR entre le gène cible et le gène de référence, dont la formule est la suivante (Pfaffl, 2001) :

$$Ratio = \frac{(\varepsilon_{gène\ cible})^{\Delta Ct\ test}}{(\varepsilon_{gène\ de\ référence})^{\Delta Ct\ témoin}}$$

Le modèle de Pfaffl constitue une amélioration par rapport à la méthode classique de la quantification relative, mais plusieurs gènes de référence ne peuvent pas être traités. Par conséquent, ce modèle a été étendu et se présente comme suit (Hellemans et al., 2007) :

$$Ratio = \frac{(\varepsilon_{gène\ cible})^{\Delta Ct\ test}}{(G1_i * G2_i * \dots * Gx_i)^{1/n}}$$

Avec :  $G1_i, G2_i, \dots, Gx_i$  les valeurs de  $C_T$  de chaque gène de référence pour chaque échantillon  $i$  et  $n$  le nombre de gène de référence



La stabilité du gène de référence conditionne donc les résultats de la quantification relative quel que soit le modèle choisi. En effet, si l'expression du gène de référence est altérée par les conditions expérimentales, alors les résultats obtenus peuvent être incorrects (Dheda et al., 2005). Une procédure d'évaluation de la stabilité d'un gène candidat en tant que gène de référence a été établie et passe par le calcul d'une valeur de stabilité, facilement calculable par le module geNorm intégré dans le logiciel qBase+ (Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2007). Plus cette valeur de stabilité, notée  $M$ , est petite, plus l'expression du gène est stable, et réciproquement (Vandesompele et al., 2002).

Le choix entre les deux méthodes de quantification dépend de plusieurs facteurs. D'une part, la quantification absolue permet de connaître la quantité précise d'ADN dans l'échantillon, alors que la quantification relative est choisie pour comparer les différences d'expression entre plusieurs conditions. D'autre part, le choix de la méthode dépend de la quantité d'échantillon à analyser. En effet, pour une quantification absolue, la réalisation d'une courbe étalon est nécessaire pour chaque gène étudié, ce qui implique une augmentation des coûts et une réduction du nombre de gènes cibles à analyser au cours d'une même analyse. Enfin, la quantification relative requiert l'utilisation de gènes de référence dont le choix est crucial pour une comparaison précise et exacte des niveaux d'expression des gènes cibles (Nolan et al., 2006; Derveaux et al., 2010).

#### 4.3.2 Séquençage des ARN ou RNA-sequencing

Initialement, l'étude du transcriptome se faisait par RT-qPCR avec un faible débit d'analyse sur des gènes connus uniquement puis les puces d'expression ou puces à ADN (*microarrays*) ont fait leur apparition, augmentant le débit d'analyse (Chan et al., 2007; Bae et al., 2011). La base de fonctionnement des *microarrays* repose sur la capacité d'hybridation de l'ADNc à ses séquences complémentaires immobilisées au préalable sur un support solide (Lowe et al., 2017). Cette méthode permet une quantification à plus grande échelle comparée à la technique de RT-qPCR. Néanmoins,

à l'instar de la RT-qPCR, le microarray est une méthode ciblée puisqu'il est nécessaire de connaître au préalable les séquences des gènes étudiés.

L'avènement des techniques de séquençage a donné la possibilité de procéder à l'étude globale non ciblée de l'ensemble des ARN d'une cellule à un temps donné (Lowe et al., 2017). La technologie de séquençage des ARN ou *RNA-sequencing* (RNA-seq) a été développée dans les années 2000 (Mortazavi et al., 2008). Le RNA-seq est une technique plus sensible et plus précise pour le suivi de l'expression des gènes en comparaison à la technique de puces à ADN (Liu, 2024). Cette technique se reposant sur le séquençage de l'ADNc obtenu après rétrotranscription des ARNm extraits, la procédure de préparation des échantillons est similaire à la méthode de séquençage de l'ADNg présentée ci-dessus : extraction des ARN, fragmentation, synthèse des ADNc (possibilité de la réaliser avant la fragmentation), ajout des adaptateurs, amplification par pont, séquençage des ADNc, puis alignement et analyse des données (Lowe et al., 2017).

#### 4.3.2.1 Analyse des données de RNA-seq

Les expériences de RNA-seq génèrent un grand volume de données, dont l'analyse se fait par l'utilisation de la bioinformatique (Lowe et al., 2017). De multiples *pipelines* sont possibles exploitant différents outils selon le contexte biologique et le cadre expérimental (Jiang et al., 2024). Les premières étapes d'analyse, c'est-à-dire le pré-traitement des données brutes (*demultiplexing*, *trimming adapters*, et le contrôle qualité) et l'alignement des *reads*, sont communes aux étapes effectuées pour l'analyse des données de séquençage d'ADN (Cf. Chapitre 4 – 4.1.3). Après l'alignement des *reads* sur un génome de référence, une étape de quantification est réalisée. Cette étape permet d'estimer les niveaux d'expression des gènes et d'obtenir un nombre de *counts* par gène. Plus le nombre de *counts* est élevé, plus le fragment d'ADNc a été retrouvé. (Deshpande et al., 2023). L'ensemble de ces étapes de traitement des données impliquent les échantillons biologiques de manière indépendante. Par conséquent, il est important d'évaluer la qualité globale de l'ensemble des données de RNA-seq en

vérifiant la reproductibilité entre les échantillons provenant d'un même réplicat (technique ou biologique) (Conesa et al., 2016). Une analyse en composante principale (ACP ou PCA, *Principale Composante Analysis*) est réalisée. Les échantillons dont les conditions expérimentales sont identiques doivent se regrouper sur l'ACP (Conesa et al., 2016). Si les échantillons sont homogènes, alors l'analyse statistique de l'expression des gènes peut être effectuée.

Suite à la quantification de l'expression des gènes, un nombre de *counts* par gène est obtenu. Les *counts* ne peuvent pas être comparés entre eux, car ceux-ci sont affectés par la longueur de la transcription ou les biais de séquençage (Conesa et al., 2016). Par conséquent, les *counts* sont convertis en RPKM (reads per kilobase per million) ou en FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads), ces deux méthodes étant équivalentes (Conesa et al., 2016). Elles permettent de normaliser l'échantillon et de supprimer les effets de la longueur de la transcription et la taille de la banque (Conesa et al., 2016). L'analyse différentielle de l'expression des gènes est ensuite réalisée à partir des *counts* normalisés afin d'obtenir des niveaux d'expression des gènes et de mesurer les différences de niveaux d'expression entre différentes conditions (par exemple : cellules ayant subi un traitement *versus* cellules sans traitement) (Deshpande et al., 2023). Cette analyse permet de savoir si les différences de niveaux d'expression observées sont significativement différentes ou non et ainsi comprendre le métabolisme de l'organisme lors d'une condition particulière à un moment donné (Deshpande et al., 2023). L'outil le plus couramment utilisé pour l'analyse d'expression de gènes est l'outil DESeq2 (Love et al., 2014).

Enfin, la visualisation de l'expression des gènes est un élément clé pour discerner des différences entre les échantillons ou les gènes eux-mêmes (Koch et al., 2018). Différentes méthodes sont possibles pour la visualisation des données de RNA-seq (Conesa et al., 2016). Deux niveaux de visualisation sont possibles : une visualisation globale entre les échantillons ou une visualisation de gènes précis (Koch et al., 2018). Par exemple, la réalisation de *scatter plots* permettent de montrer la corrélation entre

deux échantillons, alors qu'une carte thermique ou *heatmap* permet la visualisation de l'expression des gènes. Il est également possible de regrouper les gènes selon leur profil d'expression (*cluster*).

#### 4.3.2.2 Évolution des techniques de RNA-sequencing

Au fil du temps et grâce à l'évolution des technologies de séquençage, plusieurs variantes du RNA-seq ont été développées dans le but de répondre à des besoins spécifiques de recherche (Pareek et al., 2011).

Le séquençage des petits ARN ou small RNA-seq permet de séquencer des petits ARN (inférieurs à 200 pb), tels que les microARN (miRNA), les petits ARN interférents (siRNA) ou les ARN piwi-interacting (piRNA, présents dans les cellules animales) pour étudier les régulateurs post-transcriptionnels (Pareek et al., 2011). Par exemple, l'étude de Ramsingh et al. (2010) a identifié les sites de liaisons des microARN différemment exprimés chez un patient atteint de leucémie myéloïde aiguë.

La transcriptomique de cellule unique ou *single cell* RNA-seq (scRNA-seq) se concentre sur les cellules individuelles au sein d'une population. Ce concept est né en 2009 avec une étude sur un blastomère de souris (Tang et al., 2009). Cette technique change d'échelle et compare les transcriptomes de cellules individuelles au sein d'une population cellulaire (Liu, 2024). Les cellules sont isolées à l'aide de la microfluidique (encapsulation des cellules dans des gouttelettes d'huile) ou par un tri des cellules par fluorescence (cytométrie en flux) ou par microdissection (isolement de tissu) (Hwang et al., 2018). Une fois la cellule isolée, les étapes suivantes (préparation de la librairie, séquençage) sont identiques à la technique de RNA-seq classique. Dans les années à venir, la technique de scRNA-seq devrait aider à améliorer la compréhension de cellules particulières, comme les tumeurs, et ainsi aider à l'identification de nouvelles thérapies (Haque et al., 2017).

En conclusion, le RNA-sequencing et la RT-qPCR sont deux techniques complémentaires. Le RNA-seq est idéal pour les études exploratoires et globales, tandis que la RT-qPCR est parfaite pour la validation ciblée et la quantification de gènes d'intérêt. Ci-dessous, un tableau récapitulatif des deux méthodes (Tableau 4-1).

**Tableau 4-1.** Comparaison entre deux méthodes d'exploration du transcriptome : le RNA-sequencing et la RT-qPCR. Tableau récapitulatif d'après Liu (2024); Lowe et al. (2017); Pareek et al. (2011).

	<b>RNA-Sequencing</b>	<b>RT-qPCR</b>
<b>Principe</b>	Séquençage des ARN pour analyser l'expression des gènes du transcriptome dans sa globalité	Transcription inverse des ARN en ADNc, suivie d'une amplification et d'une quantification des ADNc pour mesurer l'expression de gènes spécifiques
<b>Échelle d'analyse</b>	Analyse à grande échelle	Analyse ciblée
<b>Capacité d'analyse</b>	Analyse de l'ensemble du transcriptome, identification et quantification de tous les transcrits (codants et non codants), découverte de nouveaux gènes ou de mutations	Analyse ciblée de gènes spécifiques prédéfinis, aucune détection de nouveaux gènes ou de mutations (sauf si les mutations et les gènes sont connus, alors design des amorces en conséquence)
<b>Sensibilité</b>	Très sensible, détection de niveaux d'expression très faibles	Sensible
<b>Spécificité</b>	Très spécifique grâce à l'utilisation de séquences uniques	Très spécifique si les amorces et sondes sont bien conçues
<b>Quantification</b>	Quantification précise des nombres de transcrits	Quantification relative par rapport à un contrôle
<b>Préparation des échantillons</b>	Complexe : extraction des ARN de haute qualité et préparation d'une librairie de séquençage	Simple : extraction des ARN, transcription inverse en ADNc
<b>Temps de réalisation</b>	Long : préparation des échantillons et d'une librairie de séquençage, séquençage et analyse des données	Court : quantification en quelques heures (qPCR 2/3 heures)
<b>Compétences</b>	Niveau élevé : bioinformatique pour l'analyse des données	Niveau modéré : biologie moléculaire pour l'exécution et pour l'analyse des données
<b>Applications</b>	Recherche exploratoire, analyse globale du transcriptome, découverte de biomarqueurs ou de nouveaux transcrits	Validation de résultats, analyse de gènes cibles, diagnostic clinique
<b>Coût</b>	Plus coûteux Nécessite des équipements spécialisés (appareil de séquençage)	Moins coûteux Utilise des équipements couramment retrouvés en laboratoire

Dans ce travail de thèse, les deux méthodes ont été utilisées. Le RNA-sequencing nous a permis d'obtenir une vision globale de l'expression des gènes pour différentes conditions de culture à un temps précis. Cette première analyse a permis la sélection de gènes de cible pour une étude approfondie en RT-qPCR. La méthode de RT-qPCR nous a permis une analyse « haut débit » de l'expression des gènes dans d'autres conditions de culture et à plusieurs temps de la phase de croissance.

# RESULTATS EXPERIMENTAUX

---

# **PARTIE 1**

## **Caractérisations génotypique et phénotypique de *Listeria monocytogenes* Lm208**



Ce travail de thèse vise à comprendre le comportement de la souche de *Listeria monocytogenes* CNL 895805 (nommée Lm208 dans cette étude) à basse température en présence d'acides gras exogènes. En effet, une étude préliminaire a montré que (i) *L. monocytogenes* est capable de se développer plus rapidement à basse température lorsque des acides gras insaturés sont présents dans le milieu extracellulaire, et (ii) la souche Lm208 est celle, parmi les neuf souches testées, qui montre le plus fort accroissement du taux de croissance (Touche et al., 2023). Ainsi, nous avons tout d'abord cherché à mieux caractériser cette souche d'un point de vue génotypique et phénotypique.

Le premier article correspond à une version enrichie de l'article annonçant le génome de la souche Lm208, soumis à *Microbiology Resource announcements*, et intitulé « High-quality genome assembly of *Listeria monocytogenes* Lm208 (CNL895805) : a wild-type strain able to grow faster in the presence of exogenous unsaturated fatty acids at low temperature » (BioProject No. PRJNA1074122, BioSample No. SAMN39851069). Cet article décrit les méthodes que nous avons utilisées pour séquencer le génome, l'annoter automatiquement, puis l'enrichir manuellement l'annotation des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. Nous avons tout particulièrement veillé à l'annotation des protéines FakA/FakB, impliquées dans l'incorporation des acides gras, et des protéines Fab impliquées dans le système FASII. Nous avons également mis en évidence, avec l'annotation, plusieurs gènes interrompus, notamment *agrA* qui apparaît comme deux loci contigus.

Le deuxième article vise à compléter les données phénotypiques acquises précédemment sur les caractéristiques de croissance de Lm208 au froid en présence d'acides gras exogènes. L'étude préliminaire a montré que : (i) Lm208 se développe plus rapidement au froid en présence de divers acides gras insaturés (#C18:1, #C18:2, #C18:3), et qu'au contraire sa croissance est inhibée par la présence d'acides gras saturés (#C14, #C16), (ii) la présence d'acides gras insaturés ou saturés ne modifie pas la croissance de Lm208 à 37°C, et (iii) les acides gras, quelle que soit leur nature, sont

incorporés en plus grande proportion à 5°C qu'à 37°C (Touche et al., 2023). De ce fait, l'objectif de ce travail était de compléter ces données phénotypiques en élargissant la gamme des acides gras testés à des structures différentes (AG saturés à chaîne plus courte, autres AG mono-insaturés, AG poly-insaturés à chaîne longue) et en estimant un éventuel effet de leur concentration. Nous avons donc testé l'impact sur la croissance et la composition membranaire de l'acide laurique (C12), l'acide palmitoléique (C16:1), l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3 $\omega$ 3 ou ALA), l'acide eicosapentaénoïque (C20:5 ou EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (C22:6 ou DHA) avec l'objectif d'explorer le lien entre les caractéristiques biochimiques des acides gras exogènes et le comportement de la bactérie à basse température. Nous avons alors pu montrer que le taux de croissance de Lm208 à 5°C pouvait être mis en relation avec la température de fusion des phospholipides membranaires (WAMT) calculée à partir des proportions de chaque AG dans la membrane et de leur point de fusion individuel. Nous avons ainsi pu montrer qu'une température de fusion membranaire autour de 20°C permet une croissance maximale de Lm208 à 5°C, alors que des valeurs supérieures ou inférieures sont moins favorables à la croissance. De plus, nous avons montré par la supplémentation en acides gras à chaîne courte que Lm208 n'est pas capable d'allonger les acides gras incorporés. Nous avons également testé l'impact de la concentration en acide gras exogène sur la croissance et la composition membranaire de Lm208 en prenant l'acide oléique (C18:1) comme exemple, et nous avons montré que la concentration a un impact croissant jusqu'à une certaine valeur seuil, ici 1% correspondant au niveau maximum à la fois d'incorporation et de taux de croissance.

# I.1. Article 1 – High-quality genome assembly of *Listeria monocytogenes* Lm208 (CNL895805): a wild-type strain able to grow faster in the presence of exogenous unsaturated fatty acids at low temperature.

---

Version enrichie de l'article soumis (juillet 2024)  
À *Microbiology Resource announcements*

Maud DARSONVAL<sup>a</sup>, Hélène GARDON<sup>b</sup>, Aurore QUILLERÉ<sup>a</sup>, Philippe VELGE<sup>c</sup>,  
Laurent GUILLIER<sup>d</sup>, Florence DUBOIS-BRISSONNET<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

<sup>b</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SAYFOOD, 91120 Palaiseau, France

<sup>c</sup>INRAE, Université de Tours, ISP, 37380 Nouzilly, France

<sup>d</sup>Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), Direction de l'évaluation des risques, 94700 Maisons-Alfort, France

## 1.1 Abstract

The genome of a non-domesticated *Listeria monocytogenes* strain, Lm208, has been sequenced and assembled. The high-quality resulting draft genome has been automatically annotated. Considering its specific ability to grow faster at low temperature in the presence of exogenous unsaturated fatty acids, the annotation of genes related to fatty acid metabolism has been deepened. Several genes involved in fatty acid uptake and metabolism (*fak* and *fab*) have been identified. Interestingly, the communication system Agr is interrupted in the locus of *agrA* with a deletion of 16 nucleotides. Consequences on growth, environmental persistence and virulence will need further studies.

## 1.2 Introduction

*Listeria monocytogenes* is a psychrophilic Gram-positive foodborne pathogen responsible for listeriosis. This ubiquitous bacterium is placed at the junction of the agri-food and health interests, due to its high prevalence in many raw materials, ready-to-eat products, and food environments, its persistence in the whole food chain, and its ability to infect humans as well as many farmed species. In 2022, 2,738 cases of listeriosis were reported by 27 European Union member states, with 49% of cases reported by Germany, France and Italy (ECDC, 2024). Recently, *L. monocytogenes* was shown to incorporate exogenous fatty acids in its membrane at low temperature (Flegler et al., 2022; Touche et al., 2023). More specifically, *L. monocytogenes* Lmo208 can grow faster at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are added to their environment (Touche et al., 2023). This ability could question new trends in reformulating food with unsaturated fatty acids to fit with nutritional claims. A better understanding of the adaptation and the growth of this pathogen in food ecosystems is a crucial public health issue to improve food safety. Hence, the genome of the strain Lm208 (CNL895805, BioSample SAMN39851069) was sequenced as a starting point of our investigation to identify genetic determinants of this overgrowth capability.

## 1.3 Genomic structure and quality metrics

Genomic DNA was extracted and purified from *L. monocytogenes* Lm208 (CNL895805, serotype 1/2a, BioSample SAMN39851069) cultivated in TSB (Tryptone Soy Broth, Biomérieux, Paris, France) overnight (16 h) using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, France) according to manufacturer's instructions for Gram-positive bacteria. DNA sequencing was performed at the "Institut du Cerveau et de la Moëlle" (ICM, France). DNA was purified with the Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter) and quantified with the Microfluidic Labchip GX (PerkinElmer). DNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols using the Nextera® XT DNA Flex Library kit (Illumina, San Diego, USA). DNA-sequencing experiments were performed on an Illumina system (NextSeq 500 sequencing system), using a paired-end

read length of 2 x 150 bp with the Illumina High Output kit v2 cartridges reagent kits. Raw reads (1,217,365 sequences with a mean length of 151 bp) were analyzed using tools available at the Galaxy portal of the MIGALE platform (<https://galaxy.migale.inrae.fr/>). Trimming was performed with Trimmomatic (v39.0 ; (Bolger et al., 2014)) by selecting Initial IlluminaClip step with Nextera Adaptor sequences with 2 mismatches allowed, and parameters set as follows: leading 3, Trailing 3, Sliding Window 4-20 and Minlen: 125 bp. The quality of 421,351 resulting trimmed reads were checked with fastQC (v0.11.9). *De novo* assembly was performed by using SPAdes (v3.15.4 ; (Bankevich et al., 2012)) with quality control done with Quast 5.2.0 (Gurevich et al., 2013), and contigs below 1000 bp have been manually deleted. Contig ordering was performed with progressiveMauve (Mauve application, 2015-02-26, (Darling et al., 2010)). When necessary, contigs were reverse complemented. The size of the genome assembly was 2,871,758 bp made of 12 contigs with a GC content of 37.9% and a N50 value of 1,458,283 bp, L50 of 1, and an average coverage of 128X. The resulting draft genome's completeness and contamination were assessed using CheckM Lineage\_WF v1.2.0 (Parks et al., 2015), revealing 99.45% of completeness and 0.27% of contamination. This high-quality resulting assembly genome was automatically annotated with Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014), a Prokaryotic genome annotation pipeline using the proteome of the reference strain *L. monocytogenes* EGD-e as reference (proteome ID: UP000000817). Clonal complex and lineage (CC) were deduced from the genome sequence using the BIGSdb platform (<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria>) (Moura et al., 2016). As the reference strains EGD and 10403S, Lm208 belongs to CC7 and lineage II. This CC gathers isolates rarely isolated from food or infected patients, contrarily to the other reference strains EGD-e and LO28 in the CC9 mostly associated with food isolates. Both CC are rarely causing human disease (Maury et al., 2016).

## 1.4 Automatic annotation and improvements with comparative genome analysis of *L. monocytogenes* Lm208 with domestic reference strains.

A total of 2,824 predicted protein-coding genes were detected with 49 tRNAs, and 4 rRNAs. Each of them received a locus tag as *Imo208\_0XXXX*. Among them, 2,686 CDS were automatically assigned to a gene name (GN) according to the locus tag of *L. monocytogenes* EGD-e reference strain (*ImoXXXX*) with Prokka. Coding sequences that were not identified or defined as “hypothetical protein” with the computational automatic tool Prokka were manually annotated. Fifty CDS were identified using *ListWiki*, *ListeriOmics*, NCBI database, or NCBI’s BLASTp against NR database (Bécavin et al., 2017; Elfmann et al., 2023). Eighty-eight CDS were not found in the *L. monocytogenes* EGD-e genome (GCF\_000196035.1) and their GN were designated as “na” (not applicable). After this process, a total of 120 CDS remains as hypothetical proteins. The Staramr tool (v0.7.2 1) revealed that the Lm208 does not harbor antibiotic resistance genes nor cryptic plasmids, similar to other *L. monocytogenes* strains (Bharat et al., 2022). Two phage regions were identified with the help of PHASTEST (<https://phastest.ca/>, accessed on 12 June 2024) (Arndt et al., 2016; Wishart et al., 2023). As already observed in EGD-e and EGD strains, the *Listeria* phage A118 (NC\_003216) prophage was observed in the *comK* integration site (Bécavin et al., 2014). A partial *Streptococcus* phage T12 (NC\_028700) was identified in the *L. monocytogenes* strain, interrupting the locus *Imo208\_02875* (*Imo0171*) with an unknown function. This 14,408 bp region contains 15 phage genes. Three contigs (No. 3, 13 and 15) displayed repeated consensus regions of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) and their associated caspase proteins (Cas) that were identified with the help of the CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>) (Couvin et al., 2018). The whole-genome average nucleotide identity (ANI) with five reference strains was calculated using FastANI (v1.3) with Lm208 as a reference (Table 1) (Jain et al., 2018). ANI analyses showed a high similarity of Lm208 with the four other reference

strains, a maximum of ANI at 99.99% with *L. monocytogenes* 10403S and a minimum of ANI at 94.94% with *L. monocytogenes* ScottA (Table 1). Molecular markers associated with *Listeria* pathogenicity island-1, LIPI-1 (*prfA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcA*, *plcB*) and the *inlA-inlB* locus containing the key genes involved in intracellular infection cycle and adhesion have been identified (Vázquez-Boland et al., 2001; Wieczorek et al., 2020). LIPI-2 associated with the hybrid sub-lineage II and serotype 4h was not found (Vilchis-Rangel et al., 2019; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). No genes from LIPI-3 and LIPI-4 gene clusters were found in the genome. LIPI-3 associated with bacterial tropism to the central nervous system of the lineage I and LIPI-4 associated with hypervirulent strains of clonal complex CC4 were not found in the genome (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023).

**Table 1-1.** Genome metrics of *L. monocytogenes* Lm208 and comparison to domestic reference strains EGD e, EGD, ScottA, LO258 and 10403S.

Strain	Genomic element	RefSeq	ANI (%)	Contig no.	Length (bp)	G+C content (%)	No. of genes	No. of CDS	No. of tRNA	No. of rRNAs	N50 (bp)	L50	Source	serovar	CC
Lm208	Chromosome		100	12	2,871,758	37.9	2824	2824	49	4	1,458,283	1	Sheep's brain	1/2a	7
EGD-e	Chromosome	GCF_000196035.1	98.94	1	2,944,528	38.0	3055	2867	67	18	2,944,528	1	derivative of EGD strain	1/2a	9
EGD	Chromosome	GCF_000582845.1	99.93	1	2,907,193	38.0	2926	2818	67	18	2,907,193	1	Guinea pig tissue	1/2a	7
10403S	Chromosome	GCF_000168695.2	99.99	1	2,903,106	38.0	2909	2802	67	6	2,903,106	1	human skin lesions	1/2a	7
ScottA	Chromosome	GCF_000212455.1	94.94	5	3,030,813	38	3058	2934	67	6	3,030,813	1	Massachusetts listeriosis outbreak	4b	7
LO28	Chromosome	GCF_021378215.1	98.90	1	2,975,254	38	3019	2911	67	6	2,975,254	1	healthy pregnant carrier	1/2c	9



## 1.5 Deep annotation of FASII and fatty acid metabolism-related genes

Considering its specific ability to grow faster at low temperature in the presence of exogenous unsaturated fatty acids, the annotation of fatty acid metabolism-related genes has been deepened. In *L. monocytogenes*, metabolism and incorporation of FA are still not well understood and gene annotation is not complete. First, in Gram-positive bacteria, exogenous FA are converted into an acyl-phosphate and incorporated through a FakAB system working as a two-component system. *fakA* and *fakB* encode FakA, a kinase with an ATP-binding able to dimerize with different isoforms of FakB, an acid-binding protein, respectively (Subramanian et al., 2022). They both belonged to the DegV family protein, referring to a group of diversified FA-binding proteins (Shi et al., 2022). In *L. monocytogenes* Lm208, FakA was identified by BLASTp using the well-described *Staphylococcus aureus* FakAB system as query sequences (Parsons et al., 2014). In Lm208, FakA protein is encoded by the *Imo208\_01648* gene. The corresponding amino-acid sequence displayed three conserved domains: the N-terminal domain containing the ATP-binding function, the linker region encoding the dimerization function with a zinc-finger motif, and the C-terminal region encoding the fatty acid-binding DegV domain (Shi et al., 2022; Subramanian et al., 2022). Two potential FakB proteins were identified by BLASTp using FakB of *S. aureus* as the query sequence. In the literature, different isoforms of FakB chains have been described with differences in selectivity. The two isoforms FakB1 and FakB2 described in *S. aureus* preferentially bind saturated and monosaturated fatty acids, respectively. The isoform FakB3 described in *Streptococcus pneumoniae* mainly binds poly-unsaturated fatty acids (Cuypers et al., 2019; Gullett et al., 2022). Based on FakB1, FakB2, and FakB3 sequences from *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp., multiple sequence alignment with Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) revealed that *Imo208\_02360* and *Imo208\_1697* encode FakB1 and FakB2, respectively. The presence of conserved

domain of all the new annotated proteins was finally checked by using the conserved Domain Architecture Retrieval Tool on NCBI (cDART, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rps>) (Geer et al., 2002). Second, we identified the Fatty Acid Binding proteins (Fab proteins) involved in the bacterial fatty acid synthesis pathway (FASII). FabG (*Imo208\_01641*), FabD (*Imo208\_01642*), FabH (*Imo208\_02040*), and FabZ (*Imo208\_02371*) were automatically identified by Prokka. The first exploration of the genome was carried out using Fab sequences of *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* or *Staphylococcus aureus* and seven putative Fab proteins were found. Then, a neighbour-joining phylogenetic tree was constructed using ClustalOmega (v1.2.4) with a data set of 114 sequences of different existing Fab from *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, and *Bacillaceae* to assign a gene name to these *fab* genes. The resulting annotation of Fab proteins is presented in Table 2 (Madeira et al., 2024).

**Table 1-2.** FASII and fatty acid metabolism related genes

Gene name	Enzyme activity	EGD-e locus	Lmo208 locus
<i>fakA</i>	fatty acid kinase	<i>lmo1814</i>	<i>lmo208_01648</i>
<i>fakB1</i>	fatty acid binding protein	<i>lmo2514</i>	<i>lmo208_02360</i>
<i>fakB2</i>	fatty acid binding protein	<i>lmo1863</i>	<i>lmo208_01697</i>
<i>fabD</i>	malonyl CoA-[acyl carrier protein] transacylase	<i>lmo1808</i>	<i>lmo208_01642</i>
<i>fabF</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>lmo2201</i>	<i>lmo208_02044</i>
<i>fabG</i>	3-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	<i>lmo2175</i>	<i>lmo208_02018</i>
<i>fabG</i>	3-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	<i>lmo1807</i>	<i>lmo208_01641</i>
<i>fabG</i>	3-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	<i>lmo1394</i>	<i>lmo208_01211</i>
<i>fabH</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>lmo2202</i>	<i>lmo208_02045</i>
<i>fabI</i>	enoyl[acyl-carrier-protein]reductase (NADH)	<i>lmo0970</i>	<i>lmo208_00800</i>
<i>fabK1</i>	enoyl[acyl-carrier-protein]reductase (NADH)	<i>lmo0814</i>	<i>lmo208_00638</i>
<i>fabK2</i>	enoyl[acyl-carrier-protein]reductase (NADH)	<i>lmo2170</i>	<i>lmo208_02013</i>
<i>fabL</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>lmo1688</i>	<i>lmo208_01521</i>
<i>fabZ</i>	3R-hydroxymyristoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	<i>lmo2524</i>	<i>lmo208_02371</i>
<i>plsX</i>	Phosphate acyltransferase	<i>lmo1809</i>	<i>lmo208_01643</i>
<i>plsY</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	<i>lmo1284</i>	<i>lmo208_01100</i>
<i>plsC</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	<i>lmo1647</i>	<i>lmo208_01464</i>

Finally, several interrupted genes were identified with the automatic annotation (Table 3). Interestingly, *agrA* locus (*Imo0051* in EGD-e strain) is annotated as two contiguous loci, *Imo208\_02761* and *Imo208\_02762* interrupted with 16 nucleotides, in the Lm208. This four-gene operon encodes the quorum sensing module AgrBD, associated with the two-component system, AgrAC. This cell-to-cell communication system, involved in adhesion to surfaces, biofilm formation, survival in soil, and host-cell invasion, has a pleiotropic effect on gene expression under various environmental conditions (Pinheiro et al., 2018). Consequences on growth, environmental persistence, and virulence of *L. monocytogenes* Lm208 will need further phenotypic exploration. Although the Lm208 genome is very close to those of reference strains (ANI above 99.9%), further investigation will be needed to identify the genetic market that could explain its specific ability to grow faster in the presence of unsaturated fatty acids. Applying a genome-wide association study with a range of non-domestic strains with the same traits could advance our understanding of this phenomenon and help the identification of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) or any kind of genetic markers.

**Table 1-3.** Interrupted loci in *L. monocytogenes* Lm208

Lm208 locus	Corresponding	Deletion	Remarks
<i>Imo208_2761</i> ————— <i>Imo208_2762</i>	<i>Imo0051</i>	Deletion of 16 bp	Response regulator of Agr communication system
<i>Imo208_00769</i> ————— <i>Imo208_00770</i>	<i>Imo0940</i>	Deletion of 69 bp	Hypothetical protein (Carbohydrate transport and metabolism)
<i>Imo208_00664</i> ————— <i>Imo208_00665</i>	<i>Imo0842</i>	Deletion of 29 bp	Hypothetical protein with cell wall anchor domain protein (LPXTG)

## 1.6 Data availability

The draft genome assembly and annotation can be found under BioProject number PRJNA1074122 and BioSample number SAMN39851069, respectively. DDBJ/ENA/GenBank under the accession number (submitted on July, 18<sup>th</sup>) and in the NCBI Sequence, Read Archive (SRA).

## 1.7 References

*Toutes les références sont reportées à la fin du manuscrit de thèse, partie « Références ».*

*La version soumise est disponible en annexe (Annexe 3).*

## I.2. Article n°2 – Differential impact of several exogenous fatty acids on membrane composition and growth abilities of *Listeria monocytogenes* at low temperature

---

Publication en cours de soumission

Aurore QUILLERÉ, Alban AMOROS,  
Maud DARSONVAL, and Florence DUBOIS-BRISSONNET

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

### 2.1 Abstract & Keywords

*Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen responsible for listeriosis, causing a real public health problem. Ubiquitous and psychrotrophic, it can be found in food processing plants and food products. To ensure food safety, the growth of the pathogen is often controlled by low temperatures. While fatty acids (FA) are known to have antimicrobial properties, we have previously shown that *L. monocytogenes* can grow faster at low temperatures in the presence of exogenous unsaturated fatty acids (#UFA). Here, we explore the link between the biochemical characteristics of various exogenous fatty acids (#FA) and the behavior of the pathogen at 5°C. Our results first show the impact of the #FA concentration on the level of incorporation in the membrane and on the growth rate. Second, we showed that all tested #FA were incorporated but at different levels. Moreover, none of them were elongated by *L. monocytogenes*. All the UFA with 18 carbons were the most efficient growth promoters, in contrast to other #UFA (shorter or longer chains) or short-chain FA such as #C12. The growth is maximized when the membrane phospholipids have a weighted-average melting temperature (WAMT) of around 18°C to 23°C. The growth rate is lower when the WAMT is lower or higher. This study underlines that the behavior

of *L. monocytogenes* depends on the biochemical nature of the fatty acids it can encounter in its environment.

**Keywords** : Exogenous fatty acids, growth promotion, cold adaptation, fatty acid incorporation, shelf-life compromising

## 2.2 Introduction

Listeriosis is one of the major human zoonoses in Europe in 2022 with 2,738 reported cases and the highest rate of case fatality (18.1%) (EFSA and CDC, 2023). Due to its ubiquitous nature, *Listeria monocytogenes* is highly prevalent in most of the raw materials of animal or vegetal origins. It is easily destroyed by temperature ( $D_{65^{\circ}\text{C}}=0.2$  to 2 min;  $z=7.5^{\circ}\text{C}$ ) (Anses, 2020) but, due to its high ability to persist in the environment, it can easily re-contaminate composite foods after cooking.

Consequently, its prevalence in ready-to-eat (RTE) foods is quite high at the manufacturing stage, in particular for fishery products (3.1% positive samples), for products of meat origin other than fermented sausages (2.5%) and fish (1.8%) (EFSA and CDC, 2023). At the distribution stage, the highest proportions of positive samples are in RTE meat products, fermented sausages (3.1%), and fish (1.5%) (EFSA and CDC, 2023). Composite salads embedded in sauces are also part of the RTE food categories. These RTE foods that can support the growth of *L. monocytogenes* are typically stored at low temperatures for limiting bacterial growth and guaranteeing that its population does not reach the regulation limit at the end of shelf-life, namely 100 CFU/g ( $n=5$ ,  $c=0$ ).

Therefore, control of product safety regarding listeriosis risk mainly lies in the control of pathogen growth at low temperatures. In previous work, we demonstrated that the growth of *L. monocytogenes* at 5°C is impacted by the type of fatty acids (FA) present in the bacterial environment (Touche et al., 2023). Globally, growth is promoted in the presence of unsaturated FA (UFA; namely C18:1, C18:2, or C18:3) and inhibited

in the presence of saturated FA (SFA; namely C14:0 and C16:0). *L. monocytogenes*, like many other bacteria, can incorporate these exogenous fatty acids (#FA) and the level of incorporation is much higher at 5°C than at 37°C (Touche et al., 2023). The high incorporation of #UFA at low temperature probably compensates for the decrease of fluidity due to low temperature whereas the incorporation of SFA increases the rigidity of the bacterial membrane.

Many foods contain lipids which are generally present in esterified forms such as surfactants (Polysorbates such as Tweens), phospholipids, or triglycerides. Triglycerides are mostly trapped into droplets but polysorbates and phospholipids can be dispersed in the aqueous phase where they can be partially broken into free FA by vegetable, animal, or bacterial lipases. Free FA can be heterogeneously distributed in food compartments where they can come in contact with bacterial food contaminants. Many types of free FA exist in the different raw materials from vegetal or animal origins. Vegetable oils mainly contain palmitic (C16:0), oleic (C18:1), and linoleic (C18:2) acids (Eskin and List, 2017). Coconut oil contains high contents of lauric acid (C12:0) (Eskin and List, 2017). Macadamia oil is a large source of palmitoleic acid (C16:1) (Nestel et al., 1994). The  $\gamma$ -linolenic acid (C18:3 $\omega$ 6; GLA) is present in soybean, canola, and linseed oils (Eskin and List, 2017). The  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3 $\omega$ 3; ALA) is abundant in flaxseed, walnut, and especially in fatty fishes (Kaplan et al., 2017). Eicosapentaenoic acid (C20:5 $\omega$ 3; EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 $\omega$ 3; DHA) are mainly associated with fish and marine vertebrates. The  $\omega$ 3 FA are highly recommended in the normal diet for their proven effect on the reduction of cardiovascular disease (Siscovick et al., 2000). Consequently, producers of composite products, especially sauces, tend to increase the proportion of UFA at the expense of SFA in their products (INRAE and Anses, 2013).

Indeed, the impact of all these types of fatty acids on *L. monocytogenes* behavior needs further investigation. The study of Touche et al. (2023) focused on five #FA only but underlined the absolute necessity to better understand the growth modifications of *L. monocytogenes* in lipid-rich foods. In this study, we evaluate the

behavior of *L. monocytogenes* in the presence of several other types of #FA to highlight the main biochemical criteria of #FA that impact *L. monocytogenes* growth at low temperatures.

## 2.3 Materials and Methods

### 2.3.1 Chemicals

Lauric acid (C12), myristic acid (C14), palmitic acid (C16), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1 $\omega$ 6), linoleic acid (C18:2 $\omega$ 6),  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3 $\omega$ 3; ALA), eicosapentaenoic acid (C20:5 $\omega$ 3; EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 $\omega$ 3; DHA) were sourced from Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden). Fatty acid (FA) is dispersed in a 5% bovine serum albumin (BSA) solution prepared in phosphate buffer at pH 8 to obtain a 4.5 mM FA solution.

### 2.3.2 Bacterial strain and culture conditions

*Listeria monocytogenes* CNL895805 (short name Lm208) (Van Langendonck et al., 1998) was stored in Tryptone Soya Broth (TSB) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) with 20% (v/v) glycerol at -80 °C. It was inoculated in TSB at 1% v/v with a standardized inoculum ( $\sim 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>) obtained after two subcultures at 30°C in the same medium. Except for control (TSB alone), TBS was supplemented with 1% BSA 5% (Control BSA), by several volumes of C18:1 in BSA solution (#C18:1) (0.01% to 2%) or by 1% of a specific exogenous FA (#FA) solution. Bacterial growth was followed for 15 days at 5°C by measuring the optical density (OD) twice a day at 600 nm (spectrophotometer Genesis 30, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). All experiments were conducted at least in triplicate with independent subcultures.

### 2.3.3 Determination of the growth rate

Maximum specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) of *L. monocytogenes* were estimated from the OD<sub>600</sub> growth kinetics by fitting the modified Gompertz model using the complementary macro SolverAid (de Levie, 2012).



### 2.3.4 Membrane fatty acid analysis

Bacterial cultures grown as described above were harvested by centrifugation (7,000 g, 4°C) in the early stationary phase according to OD growth curves. Pellets were washed twice with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to remove non-incorporated #FA (Brinster et al., 2009). Extraction and methylation of FA were carried out directly on bacterial pellets as previously described (Dubois-Brissonnet et al., 2016; Touche et al., 2023). FA of whole cells were first saponified and esterified by methanolic NaOH and methanolic HCl (1<sup>st</sup> step: 1 mL NaOH 3.75 M in 50% v/v methanol solution for 30 min at 100°C; 2<sup>nd</sup> step addition of 2 mL HCl 3.25 M in 45% v/v methanol solution for 10 min at 80°C). Fatty acid methyl esters (FAME) were extracted with a diethyl ether / cyclohexane solution (1:1 v/v). The organic phase was then washed with a dilute base (NaOH 0.3 M). Analytical gas chromatography of FAME was carried out on a GC-MS Trace 1300 / ISQ 7000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) equipped with a BPX70 capillary column (25m, 0.22 mm id) (SGE, Victoria, Australia). Column temperature was set at 100°C for 1 min and then increased to 170°C at the rate of 2°C/min.

FAME were expressed as a percentage of the total area and grouped in classes: saturated fatty acids (SFA), unsaturated fatty acids (UFA), *iso*- and *anteiso*- branched-chain fatty acids (*i*-BFA and *ai*-BFA). The weighted-average melting temperature (WAMT) of the membrane is calculated from the melting temperature of each individual FA and its ratio in the membrane composition (Seel et al., 2018):

$$\text{WAMT } (^{\circ}\text{C}) = \sum_n^1 T_i \cdot \text{FA } (\%)_i \quad (2)$$

where  $T_i$  (°C) is the melting temperature of  $\text{FA}_i$ ,  $\text{FA}(\%)_i$  is the percentage of  $\text{FA}_i$ , and  $\text{FA}_1$  to  $\text{FA}_n$  are each of the FA present in the membrane composition. Melting temperatures of FA (°C) were obtained from CAS Common Chemistry (<https://commonchemistry.cas.org/>). All experiments were conducted at least in triplicate with independent subcultures.

### 2.3.5 Statistics

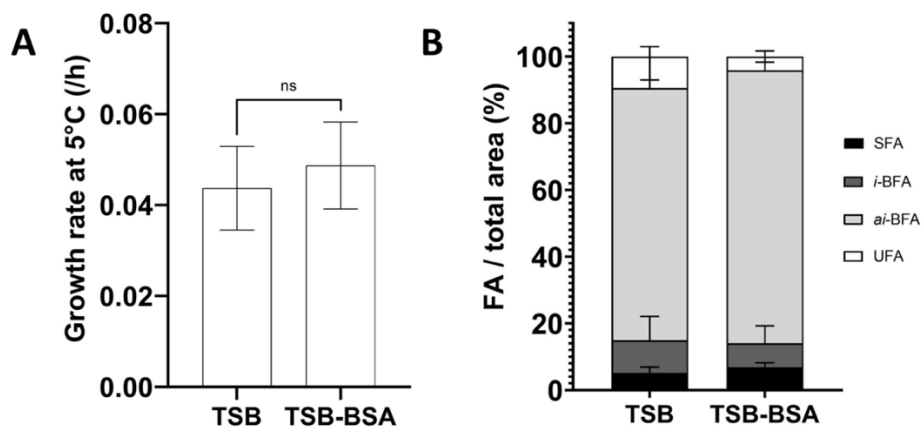
Statistical analyses were performed using GraphPad Software 9.2.0 (Prism, USA). Means and standard deviations are represented on each figure. The number of replicates is indicated in the figure legend. Two-tailed paired Student's t-tests were performed between growth rates or WAMT°C of each condition and the control in Figures 2-1, 2-2, 2-3 and 2-4. Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison tests (95% confidence interval) were performed between the four categories of membrane FA (SFA, *i*-BFA, *ai*-BFA and UFA) of each condition and the control. According to the *p*-value, results are reported as non-significant or significantly different: 0.1234 (ns), 0.0332 (\*), 0.0021 (\*\*), 0.0002 (\*\*\*), < 0.0001 (\*\*\*\*).

## 2.4 Results

### 2.4.1 The addition of BSA in TSB does not change the growth rate and membrane composition

The first step of this study was to determine the impact of the BSA solution pH 8, which is required to disperse #FA in the aqueous TSB, on bacterial growth rate and membrane composition when used alone at 0.05%. The growth of Lm208 was followed at 5°C in control (TSB) and control supplemented with the BSA solution (TSB-BSA). Growth rates are not significantly different between the two cultures ( $0.044 \pm 0.009/h$  and  $0.049 \pm 0.010/h$ , respectively) (Figure 2-1.A).

The FA composition of *L. monocytogenes* at 5°C without supplementation mainly consists of BFA with *ai*-BFA (*ai*-C13, *ai*-C15, *ai*-C17) and *i*-BFA (*i*-C14, *i*-C15, *i*-C16, *i*-C17) (Table 1). The three most abundant BFA at 5°C are *ai*-C13 ( $14.5 \pm 7.9\%$ ) and *ai*-C15 ( $65.7 \pm 9.9\%$ ). SFA and UFA are also present in the membrane in particular C16:0 ( $3.3 \pm 1.4\%$ ) and C18:1 ( $6.4 \pm 6.8\%$ ). None of the membrane FA categories (*ai*-BFA, *i*-BFA, SFA, UFA) showed a significant difference between TSB-BSA and TSB cultures (Figure 2-1.B).

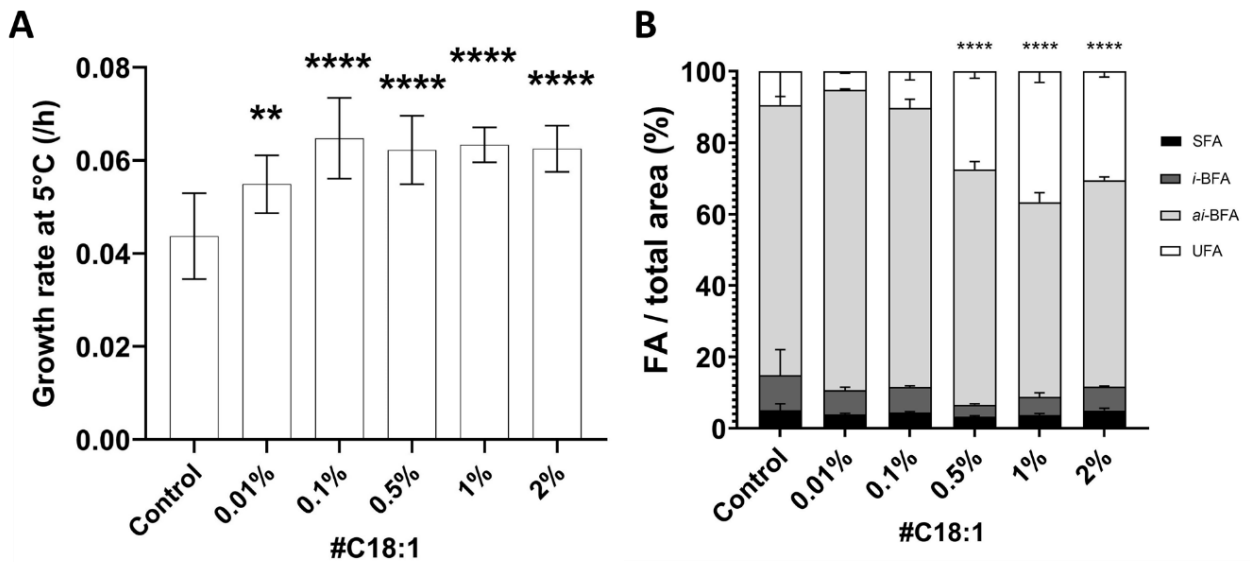


**Figure 2-1.** Growth rates (A) (n=20) and fatty acid composition expressed in four categories (SFA, i BFA, ai BFA and UFA) (B) (n=5 to 6) of *L. monocytogenes* when grown in TSB with or without 0.05% BSA

## 2.4.2 The concentration of #C18:1 impacts the growth rate and the membrane composition

The growth of Lm208 was followed at 5°C in TSB supplemented with different concentrations of oleic acid (#C18:1). The growth rate of Lm208 at 5°C is significantly higher with #C18:1 addition than the control ( $0.044 \pm 0.009/h$ ) since the lowest concentration tested #C18:1-0.01% ( $0.055 \pm 0.006/h$ ). In addition, the growth rate increased with #C18:1-0.1% ( $0.065 \pm 0.009/h$ ), and all the cultures with a higher concentration have similar growth rates ( $0.062 \pm 0.007/h$ ,  $0.063 \pm 0.004/h$ ,  $0.063 \pm 0.005/h$  for #C18:1-0.5%, #C18:1-1%, and #C18:1-2%, respectively) (Figure 2-2.A). From #C18:1-0.1% to 2%, the ratio  $\mu_{\max}(\#UFA) / \mu_{\max}(\text{control})$  was above 1.4.

The membrane composition of Lm208 is highly modified when the medium is supplemented with #C18:1 at 5°C. UFA proportions in Lm208 membrane gradually increase when the concentration of #C18:1 increases from 0.1% to 2%. They are significantly different from the control for 0.5% ( $27.5 \pm 1.9\%$ ), 1% ( $44.5 \pm 8.8\%$ ) and 2% ( $30.5 \pm 1.6\%$ ). SFA and *i*-BFA proportions do not significantly change whatever the culture. Only *ai*-BFA proportions decreased when UFA proportions increased (Figure 2-2.B).



**Figure 2-2.** Growth rates (A) (n=8 to 20) and fatty acid composition expressed in four categories (SFA, i BFA, ai BFA and UFA) (B) (n=4 to 10) of *L. monocytogenes* when grown in TSB supplemented with different concentrations of oleic acid. #C18:1 1% is 1% of the 4.5

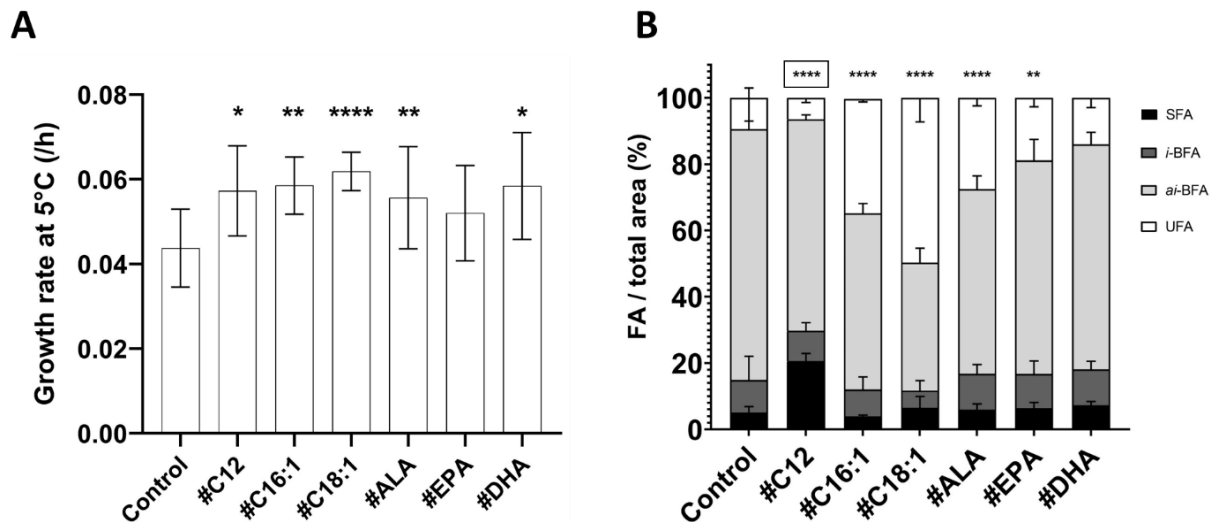
### 2.4.3 The type of #FA impacts the growth rate and the membrane composition

The growth of Lm208 was followed at 5°C in TSB supplemented with different types of #SFA or #UFA, namely lauric acid (#C12:0), palmitoleic acid (#C16:1),  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3 $\omega$ 3; #ALA), eicosapentaenoic acid (#C20:5 $\omega$ 3; #EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 $\omega$ 3; #DHA).

The tested #FA supplementations, except #EPA, induced a significant increase in the growth rate of Lm208 at 5°C in comparison with the control (Figure 2-3.A). The ratio  $\mu_{\max}(\text{\#UFA}) / \mu_{\max}(\text{control})$  was 1.4 for #C18:1, 1.3 for #C12, #ALA and #DHA and 1.2 for #C16:1 and #EPA (not significant).

In the presence of #UFA at 5°C, UFA in Lm208 membrane composition increased significantly except for #DHA cultures. This increase is due to the direct incorporation of the added #FA without elongation (Table 1). UFA ratios in the membrane at 5°C were  $44.5 \pm 8.8\%$  with #C18:1,  $34.5 \pm 0.88\%$  with #C16:1,  $27.6 \pm 2.4\%$  for #ALA, and  $18.9 \pm 2.7\%$  for #EPA, all of them significantly different from the control (Figure 2-3.B).

SFA and *i*-BFA proportions do not significantly change. Only *ai*-BFA proportions decreased when UFA proportions increased. With #C12 supplementation, the level of SFA in the Lm208 membrane significantly increased ( $20.6 \pm 2.3\%$ ) (Figure 2-3.B). UFA was not significantly different from the control in #C12 cultures (Figure 2-3.B).



**Figure 2-3.** (A) Growth rates at 5°C (h<sup>-1</sup>) (n=5 to 20) and (B) fatty acid composition (n=3 to 10) expressed in four categories (SFA, *i* BFA, *ai* BFA and UFA) (\*\*\*\* indicates a significant difference in UFA proportions, \*\*\*\* indicates a significant proportion in SFA) of *L. monocytogenes* when grown in TSB supplemented with different #FA

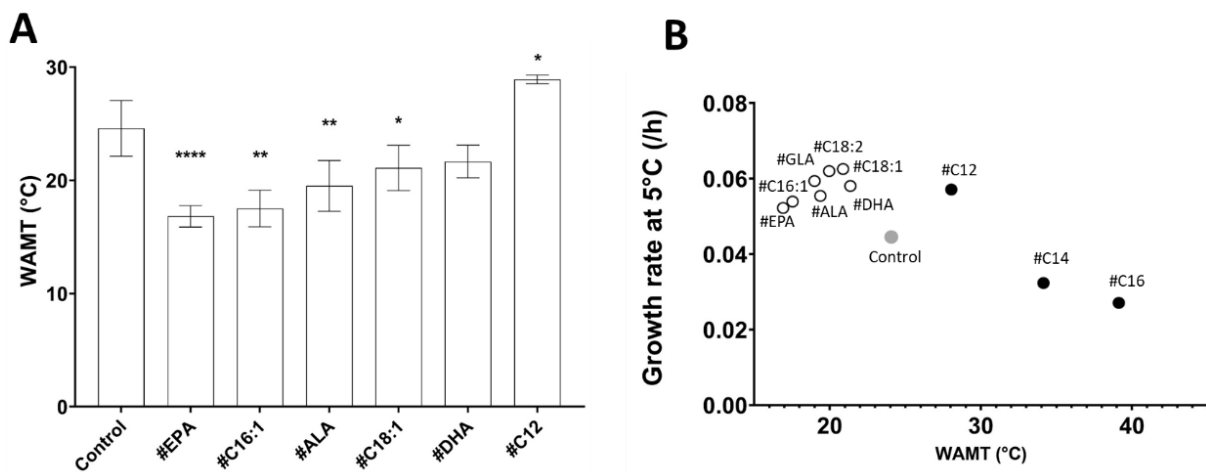
Overall, the only proportion that increases in the membrane is the #FA proportion itself (Table 4). #FA are all incorporated in the membrane without elongation whatever their chain length and level of unsaturation.

**Table 2-1.** Fatty acid composition of *L. monocytogenes* grown in presence of several #FA (%/total area)

	Control	#C12:0	#C16:1	#C18:1	#ALA	#EPA	#DHA
<b>C12:0</b>	0.38 ± 0.75	11.60 ± 0.22	ND	ND	ND	ND	ND
<b><i>ai</i>-C13:0</b>	14.53 ± 7.91	10.34 ± 0.93	10.19 ± 3.01	6.38 ± 5.25	4.58 ± 3.29	5.42 ± 3.23	5.83 ± 1.28
<b><i>i</i>-C14:0</b>	3.91 ± 4.80	6.11 ± 1.97	6.24 ± 2.30	3.04 ± 1.41	8.03 ± 2.09	6.56 ± 2.89	5.91 ± 1.16
<b>C14:0</b>	0.34 ± 0.67	1.08 ± 0.10	0.23 ± 0.27	0.31 ± 0.55	0.15 ± 0.23	0.52 ± 0.30	0.48 ± 0.33
<b>C14:1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><i>i</i>-C15:0</b>	2.99 ± 1.99	2.81 ± 0.68	1.60 ± 1.41	2.11 ± 0.99	2.72 ± 1.41	3.36 ± 0.79	4.24 ± 0.79
<b><i>ai</i>-C15:0</b>	65.66 ± 9.90	53.05 ± 2.31	42.74 ± 1.44	38.53 ± 6.99	51.02 ± 2.52	58.66 ± 6.25	61.36 ± 2.62
<b>C15:0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><i>i</i>-C16:0</b>	ND	0.20 ± 0.18	0.22 ± 0.29	ND	0.06 ± 0.15	0.37 ± 0.38	0.66 ± 0.51
<b>C16:0</b>	3.30 ± 1.44	5.23 ± 1.37	3.64 ± 0.44	4.17 ± 1.08	5.55 ± 1.45	4.62 ± 1.25	5.08 ± 0.90
<b>C16:1</b>	ND	0.20 ± 0.17	31.13 ± 0.64	ND	ND	0.17 ± 0.16	0.26 ± 0.31
<b><i>i</i>-C17:0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b><i>ai</i>-C17</b>	0.22 ± 0.43	0.37 ± 0.32	0.22 ± 0.26	0.04 ± 0.12	0.07 ± 0.16	0.36 ± 0.34	0.71 ± 0.16
<b>C18:0</b>	2.29 ± 1.45	2.73 ± 1.13	0.10 ± 0.19	0.94 ± 1.57	0.25 ± 0.60	1.26 ± 0.34	1.69 ± 0.15
<b>C18:1</b>	6.38 ± 6.80	4.08 ± 0.76	3.37 ± 0.51	44.26 ± 8.53	4.68 ± 1.03	3.62 ± 0.61	3.46 ± 0.41
<b>C18:2</b>	ND	2.20 ± 0.59	ND	ND	0.57 ± 0.66	2.57 ± 0.61	2.24 ± 0.41
<b>ALA</b>	ND	ND	ND	ND	22.32 ± 1.55	ND	ND
<b>GLA</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>EPA</b>	ND	ND	ND	ND	ND	12.51 ± 1.38	ND
<b>DHA</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.06 ± 1.87

The weight-average melting temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) is calculated from the proportion of each FA in the membrane phospholipids and their melting point. Each #UFA significantly induced a decrease in the membrane WAMT (except #DHA) whereas #C12 induced a significant increase (Figure 2-4.A).

Data of growth rates of Lm208 obtained with each of the supplementations, from this study or Touche et al (2023), were plotted as a function of the corresponding WAMT ( $^{\circ}\text{C}$ ) of the bacterial membrane (Figure 2-4.B). The WAMT of the control is  $24.6 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ . All mono- or poly- #UFA with 18 carbons induced a decrease in membrane WAMT $^{\circ}\text{C}$  between  $19^{\circ}\text{C}$  and  $21^{\circ}\text{C}$  together with an increase in growth rate (around 0.06/h). For #EPA and #C16:1, the membrane WAMT $^{\circ}\text{C}$  is lower than  $18^{\circ}\text{C}$ , the growth rate is lower than the maximum value, and the lower the WAMT the lower the growth rate. When a #SFA is incorporated, the membrane WAMT increases from  $28^{\circ}\text{C}$  to  $41^{\circ}\text{C}$ . The higher the WAMT, the lower the growth rate. The growth rate is maximum when the WATM is between  $18^{\circ}\text{C}$  to  $23^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 2-4.** (A) Weighted average melting temperature (WAMT, n=3 to 10) of the membrane fatty acids of *L. monocytogenes* at  $5^{\circ}\text{C}$  with #FA supplementation or without (control) and (B) relationship between WAMT and growth rate for #UFA (○), control (●) and #SFA (●).

## 2.5 Discussion

In our previous paper (Touche et al., 2023), we demonstrated that #C18:1, #C18:2, and #C18:3, but not #C14 and #C16, are growth promoters of *L. monocytogenes* at low temperature. We also showed that all these #FA are over-incorporated at 5°C but not at 37°C. Here we intended to evaluate the impact of the #UFA concentration and to investigate the impact of the type and structure of #FA on *L. monocytogenes* growth.

Lipids in foods are mainly in esterified form but free fatty acids can also be present due to the degradation of complex lipids by various lipases. They are generally associated with proteins and other food components which help their distribution among the food bulk. Indeed, lipids alone are not miscible to aqueous solutions due to their high level of hydrophobicity and their linkage to proteins helps dispersion. Consequently, in this work, we introduced and gently mixed free fatty acids within a bovine serum albumin solution to create weak bonds between FA and protein. Thus, we validated here that the addition of BSA alone in the culture medium does not significantly interfere with *L. monocytogenes* growth. In addition, when present in TSB supplemented with #FA, BSA is weakly linked to FA and consequently less available than in TSB-BSA alone.

Due to the structural heterogeneity of complex foods, lipids are unequally distributed in food compartments. Thus, depending on their localization, bacterial contaminants could encounter different concentrations of #FA. We explored in this study the impact of different concentrations of #C18:1 on *L. monocytogenes* growth and membrane adaptation at low temperature. The growth rate and level of incorporated #UFA are significantly different from the control since the lowest tested concentration (0.01%). Nevertheless, the growth rate increased with the concentration until 0.1% while the level of #C18:1 incorporation increased until 0.5%. Similarly, the addition of 0.001% of #C18:1 does not induce changes in the *S. aureus* membrane, whereas C18:1 was significantly incorporated when present at 0.01% in the medium



(DeMars et al., 2020). Higher concentrations, such as 1% of a 4.5 mM #UFA or #SFA solutions, significantly favored or inhibited the *L. monocytogenes* growth at 5°C, respectively (Touche et al., 2023). Moreover, 0.1% (w/v) of polysorbate P80 (esterified C18:1) or P60 (esterified C18:0), also showed an increased or reduced growth rate at 6°C (Flegler et al., 2022). Various concentrations of milk fat (0.1 to 10%) were tested on *L. casei* growth: the final population was significantly higher from 1% but not at 0.1% (Tan et al., 2012). In addition, the effect of #FA concentration can also have an impact on the #FA antibacterial effect at optimal growth temperature. For example, the percentage of inhibition of *S. aureus* growth rate increased with the concentration of #UFA such as #C18:1, #C18:2 or #C18:3 at 37°C (Zheng et al., 2005). In our study, 1% was chosen for further work because this concentration induces the highest level of incorporation and growth rate.

We observed that the phenotypic response of *L. monocytogenes* is not generalized but unique to each #FA. #UFA globally induced increased growth whereas long chain #SFA decreased growth rate (Touche et al., 2023). The ratio  $\mu_{\max}(\text{\#UFA}) / \mu_{\max}(\text{control})$  was previously evaluated at 1.4 for #C18:1, #C18:2 and #GLA (Touche et al., 2023), but was lower for #ALA, #DHA, #C16:1 and #EPA. Regarding #SFA, #C14:0 and #C16:0 were already shown to induce a significant decrease in the growth rate of Lm208 at 5°C in comparison with the control (Touche et al., 2023). The ratio  $\mu_{\max}(\text{\#SFA}) / \mu_{\max}(\text{control})$  was 0.7 for #C14 and 0.6 for #C16 (Touche et al., 2023) and lower here for #C12. Supplementation with #UFA with 18 carbons in length induced the highest increase in growth rate, in particular with #C18:1 and #C18:2. In the literature, FA solutions are often described as antimicrobial agents at optimal growth temperature and this propriety relies on the type of FA. *S. aureus* and other Gram-positive bacteria are described as highly sensitive to the antimicrobial activity of many #UFA or #SFA at 35°C but differently according to the type of #FA (Kabara et al., 1972). Kelsey et al. (2006) Kelsey et al (2006) studied the effects of #FA on *S. aureus* at 37°C and found that #C14 and more dramatically #C12 inhibited bacterial growth rate whereas #UFA achieved inhibition through a dose-dependent lag phase. Wang and

Johnson (1992) evaluated the antimicrobial properties of different ethanolic FA solutions at 37°C on *L. monocytogenes* and showed that C12:0, C18:2, and C18:3 had an inhibitory activity at 37°C from 10, 50 and 20 µg/mL, respectively, while C14:0, C16:0 and C18:1 showed no effect even at high concentration. In another context, *Enterococcus faecalis* responded differently to the FA encountered in its environment. #UFA can produce variable growth effects, #C18:2 but not #C18:1 impairing generation time but supplementation with every #UFA, but not #SFA, can overcome growth inhibition by cerulenin (Saito et al., 2018).

Our results differ from all these latter studies through two major parameters in the experimental conditions. First, the growth temperature, which drastically impacts the membrane fluidity and cell physiology, is well below the optimal temperature (5°C) in our study. Second, the FA is here weakly linked to BSA before the addition to the culture medium and not dispersed in the medium directly or through an ethanolic solution.

To make a relationship between growth rate values and the incorporation of #FA, we explored the membrane composition of cultures grown with #FA. *L. monocytogenes* membrane mainly consists of *ai*- and *i*-BFA with small proportions of SFA and UFA, as already shown in several studies (Annous et al., 1997; Hingston et al., 2017; Rogiers et al., 2017; Touche et al., 2023).. The membrane composition of *L. monocytogenes* is here highly impacted by the incorporation of the #FA which is available in the medium. Whatever the #FA, it is incorporated but the level of incorporation is different according to the type of #FA. As shown by Touche et al. (2023), the level of incorporation is significantly higher than that of #C12 ( $47.3 \pm 1.0\%$  and  $48.22 \pm 10.7\%$ , respectively) (Touche et al., 2023). The incorporation of #FA in the phospholipidic membrane was previously well-described in *S. aureus*. The #FA diffuses passively into the phospholipid membrane through FadL porin (Shi et al., 2022). It is subsequently bound to specific FakB protein according to its structure: FakB1 and FakB2 preferentially bind SFA (C14:0 to C17:0) and mono-UFA (C18:1), respectively (Shi

et al., 2022). Like *S. pneumoniae* (Shi et al., 2022), *L. monocytogenes* possesses an additional FakB3 protein, which enables the incorporation of poly-UFA (Darsonval et al., 2024). FakA, a fatty-acid kinase, phosphorylates the carboxyl head group of the FA creating an acyl phosphate (acyl-P) which is transferred to PlsY to begin membrane phospholipid synthesis at 1-position of glycerol phosphate (Shi et al., 2022). The acyl-P could also be *trans*-acylated with ACP by PlsX (Yao and Rock, 2017). The acyl-ACP is then fixed to PlsC at the 2-position of 1-acyl-glycerolphosphate for being directly integrated into the phospholipid synthesis or can enter the fatty acid elongation cycle. *S. aureus* machinery can elongate #FA. Indeed, when the medium is supplemented with #SFA C10:0 or C12:0, C14 and C16 accumulate in the membrane, suggesting uptake of the #C10:0 and #C12:0 and elongation (Sado-Kamdem et al., 2009). *S. aureus* is also able to elongate longer FA, such as C18:1 to C20:1 (DeMars et al., 2020). In contrast, we noted in this study that *L. monocytogenes* cannot elongate #FA because no FA with 2 or 4 more carbons appears in the membrane, even when short #FA such as #C12:1 was added in the medium. The elongation does not occur despite the presence of all the genes required for the elongation, namely *plsX*, *plsC* and *fabF*, in the genome of Lm208 (Darsonval et al., 2024). Consequently, the variable level of #FA incorporation in the membrane phospholipids is probably only due to #FA ability to differentially bind FakB proteins. Among #SFA, #C12:0 was already shown to be a poor substrate for the two FakB proteins of *S. aureus* (Parsons et al., 2014) and it is here probably the same with *L. monocytogenes* FakB. On the contrary, medium-chain #SFA (#C14 and #C16) are highly incorporated. They were both shown to be excellent substrates for FakB in *S. aureus* and *E. faecalis* (Parsons et al., 2014; Saito et al., 2018). This high incorporation level at low temperatures dramatically decreases the membrane fluidity and inadvertently leads to cellular toxicity and growth inhibition. The longer the #SFA tail, the higher the reduction of membrane fluidity and the higher the growth inhibition. Among #UFA, differences in levels of incorporation are also noted. #C18:1 or #C18:2 are the most incorporated, probably because of their high affinity with FakB proteins. #C16:1 and #C18:3 seem to have a less affinity to FakB2 and FakB3 than #C18:1 and

#C18:2, respectively. Similarly, in *S. aureus*, FakB2 was shown to have less affinity to #C16:1 than to #C18:1 (Parsons et al., 2014). Moreover, longer #UFA over 18 carbons, which cannot be synthesized by *L. monocytogenes* FASII system, have a minor affinity to FakB proteins and are weakly incorporated. Individual fatty acid supplementation had a wide array of growth consequences on the bacteria. In contrast to what happens at optimal temperature, where both #SFA and #UFA can have antimicrobial effects (Kabara et al., 1972; Kelsey et al., 2006), the impact of #UFA is drastically different from #SFA at low temperature. Instead of being harmful, #UFA have a positive effect by compensating for the physical decrease in fluidity and by bringing back the fluidity to an optimal value. The calculation of the melting point of the cytoplasmic membrane (WAMT) is described as an indicator of the membrane fluidity even though the latter also depends on the total polar lipid structures. At 5°C, the *L. monocytogenes* growth rate is optimum when the WAMT between 18°C and 23°C. In optimal conditions, the majority of glycerophospholipids in the bacterial membrane are organized in a lamellar state, considered the biologically active state of the membrane (Denich et al., 2003). When the fluidity is too high (WAMT below 18°C) or too low (WAMT over 23°C), the membrane of *L. monocytogenes* is not in its optimized state and the growth rate decreases.

## 2.6 Conclusion

Overall, we have demonstrated that all the #FA do not induce a common physiological response in *L. monocytogenes*. The organism responds differently to each #FA it encounters. #UFA and #C12 increase bacterial growth at low temperatures in contrast to longer chain #SFA (#C14 and #C16). #UFA with 18 carbons maintained the membrane fluidity at an optimal value (WAMT between 18°C and 23°C) at 5°C, whereas other #UFA are less efficient. To better understand specific levels of #FA incorporation, we need to further study the Fak system dedicated to fatty acid scavenging in *L. monocytogenes*. We intend in the near future to construct deletion mutants for *fakB1*, *fakB2*, and *fakB3* in Lm208 to compare their behavior in the presence

of #FA. This understanding of these specific behaviors will help in better controlling food safety in lipid-rich foods.

## 2.7 References

*Toutes les références sont reportées à la fin du manuscrit de thèse, partie « Références ».*

## **PARTIE 2**

### **Impact des acides gras exogènes sur le transcriptome de *Listeria monocytogenes***

Dans le but de comprendre l'impact d'acides gras exogènes sur les mécanismes moléculaires en lien avec leur incorporation et la croissance à basse température de *L. monocytogenes*, une analyse du transcriptome a été réalisée. L'objectif était d'identifier les déterminantes de ce phénomène et de comprendre quels sont les mécanismes mis en place par la bactérie pour permettre cette surcroissance à basse température en présence d'acides gras exogènes insaturés.

Dans ce chapitre, nous présentons dans un premier temps la méthode et les étapes d'optimisation mises en œuvre pour obtenir une analyse du transcriptome pertinente et adaptée à nos objectifs. Tout d'abord, nous présentons la méthode d'exploitation des résultats bruts de l'analyse non ciblée du transcriptome par RNA-sequencing, puis la mise au point de l'analyse ciblée du transcriptome par RT-qPCR.

Dans un second temps, les résultats des analyses non ciblée et ciblée du transcriptome ont fait l'objet d'un article intitulé « Deciphering the impact of exogenous fatty acids on *Listeria monocytogenes* at low temperature by transcriptome analysis », accepté dans le journal « *Frontiers in Microbiology* ». Dans cet article, l'objectif était de comprendre l'impact de ces acides gras exogènes (saturés, mono- et poly- insaturés) au niveau des mécanismes moléculaires de *L. monocytogenes* à basse température. Une analyse globale du transcriptome par RNA-sequencing de Lm208 à 5°C et 37°C avec ou sans supplémentation en acide oléique (#C18:1) a été effectuée. Le RNA-seq a permis la sélection de gènes d'intérêt pour une analyse ciblée du transcriptome par RT-qPCR. Cette analyse ciblée a permis d'élargir l'éventail des acides gras exogènes testés (#C14, acide myristique ; #C18:1, acide oléique ; #C18:2, acide linoléique) et de suivre le profil d'expression à différents points de la phase de croissance (milieu de la phase exponentielle, fin de la phase exponentielle, début de la phase stationnaire) à basse température. Dans le cadre de la biosynthèse des acides gras, nous avons démontré que *fabK*, un gène clé dans la synthèse des acides gras saturés, était régulé à la hausse en présence d'acides gras insaturés, mais pas en

présence d'acides gras saturés à basse température. Ces résultats permettent de faire l'hypothèse quant à la présence d'une voie de biosynthèse des acides gras insaturés chez *L. monocytogenes*, voie non identifiée à ce jour. Étonnamment, les gènes *fakA* et *fakB*, impliqués dans l'incorporation des acides gras exogènes et identifiés par l'analyse du génome (cf. Résultats expérimentaux – Partie 1), n'étaient pas significativement sur-exprimés à basse température en présence de #C18:1. L'analyse des profils membranaires n'a pas montrée de différence dans les niveaux d'incorporation des acides gras exogènes quelle que soit la phase de croissance, ce qui laisse sous-entendre que ce mécanisme d'incorporation des acides gras se met en place avant le milieu de la phase exponentielle. Enfin, de manière surprenante, les gènes impliqués dans le chimiotaxisme et l'assemblage des flagelles (en particulier *cheY* et *flaA*) étaient très fortement sur-exprimés en présence d'acides gras insaturés, mais pas en présence d'acides gras saturés à basse température. Les observations au microscope électronique à balayage ont confirmé que Lm208 avait acquis un phénotype remarquable avec des flagelles plus nombreux et plus longs uniquement en présence d'acides gras insaturés à 5°C uniquement. Les flagelles étant bien connus pour leur rôle dans la formation des biofilms, cette nouvelle découverte soulève des questions sur la structure et la persistance des biofilms, en particulier dans les environnements réfrigérés en présence de lipides insaturés.

Enfin, dans la dernière partie, nous présentons des résultats complémentaires à l'article précédent. À partir de l'analyse ciblée du transcriptome, le profil d'expression de quatre autres gènes a été suivi en RT-qPCR en présence d'acides gras exogènes de différentes natures et à différents temps de la croissance. L'étude de ces quatre autres gènes, impliqués dans d'autres voies métaboliques, permet de compléter l'exploration fonctionnelle du transcriptome de *L. monocytogenes* dans nos conditions.



## II.1. Optimisation de la méthode d'analyse du transcriptome

---

### 1.1 Optimisation de l'exploitation des résultats bruts de l'analyse non ciblée du transcriptome

L'analyse non ciblée du transcriptome (RNA-seq) de *L. monocytogenes* Lm208 a été réalisée à partir de quatre conditions de culture : à 5°C et à 37°C avec ou sans supplémentation en acide oléique (#C18:1) avec trois réplicats biologiques par condition. Les abréviations « FA » et « C » correspondent respectivement aux conditions avec #C18:1 et aux conditions contrôles sans supplémentation en acides gras ; et « 37 » et « 5 » correspondant aux températures de culture utilisées.

Le séquençage des ARN a été réalisé par la plateforme I2BC – Institute for Integrative Cell Biology (Université de Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France, <https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>). La plateforme nous a fourni l'ensemble des *counts* par gène pour chaque réplicat biologique de chaque condition de culture testée. La plateforme nous a également fourni une analyse en composante principale (ACP) permettant de valider la reproductibilité des réplicats biologiques (Figure 1-1), ainsi qu'une première analyse différentielle de l'expression des gènes de quatre comparaisons deux à deux, soit « FA5.vs.C5 » ; « FA37.vs.C37 » ; « C5.vs.C37 » et « FA5.vs.FA37 ».



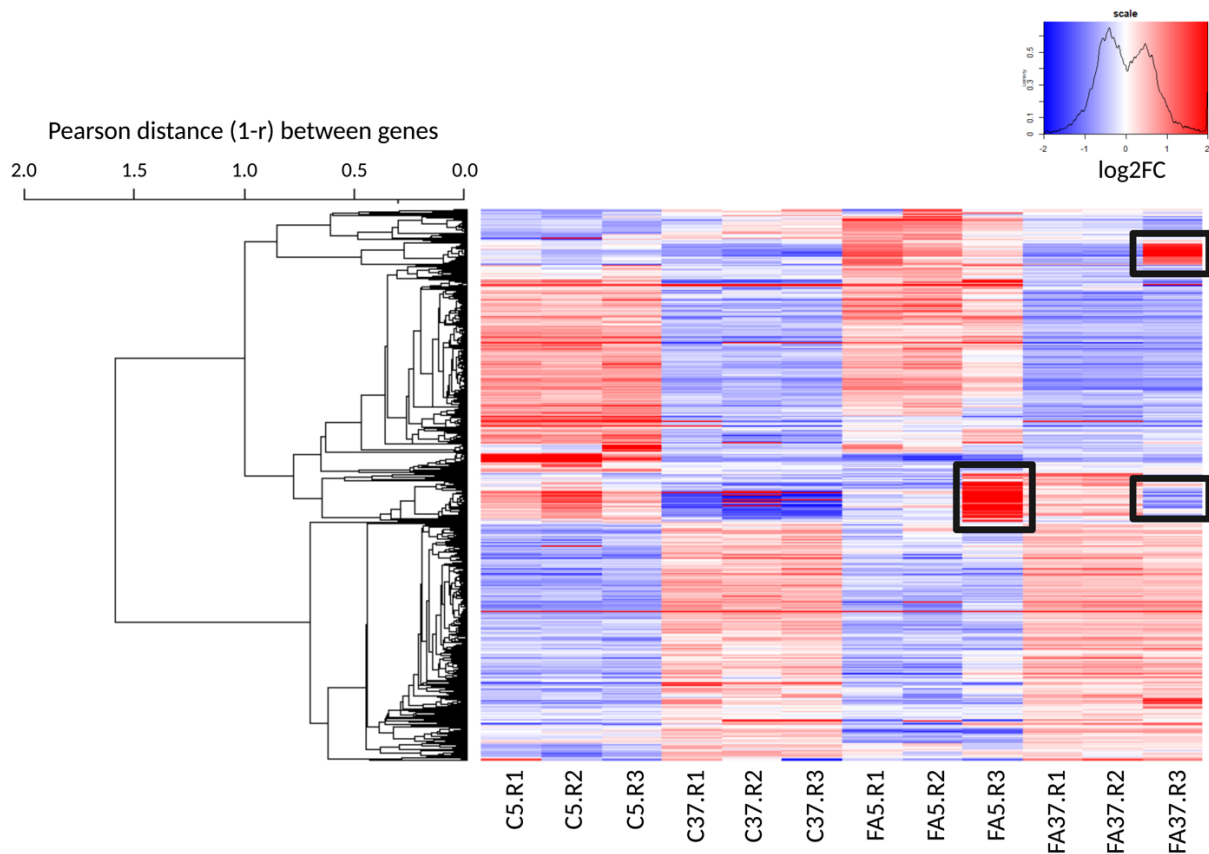
**Figure 1-1.** Analyse en Composante Principale (ACP) sur les *counts* bruts de chaque réplicat biologique. « FA » et « C » font référence aux cultures de *Listeria monocytogenes* Lm208 cultivées avec ou sans supplémentation en acides gras exogènes (#C18:1). « 5 » et « 37 » font référence à la température de culture.

Dans le but d’avoir la main sur les données de l’analyse différentielle de l’expression des gènes, nous avons refait l’analyse des *counts* bruts en utilisant le langage de programmation R, sur l’interface utilisateur Rstudio (<https://posit.co/download/rstudio-desktop/>). Pour ce travail, nous avons reçu l’appui de Pierre NICOLAS (Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, Jouy-en-Josas, France). La procédure suivie pour le traitement des *counts* brut est détaillée dans la partie suivante (Cf. Résultats expérimentaux, Partie 2 – 2.3). Cette procédure d’analyse a été validée manuellement par comparaison avec les résultats de l’analyse différentielle fournie par la plateforme.

À la suite de l’analyse, les représentations graphiques réalisées, telles que l’arbre de classification hiérarchique (CAH) des réplicats biologiques et le diagramme exprimant le nombre de gènes différentiellement exprimés, nous ont permis de voir que l’effet de la basse température avait un impact plus important sur l’expression des gènes par rapport à l’effet de l’acide gras. Par conséquent, nous avons réitéré l’analyse des données du transcriptome en ajoutant les comparaisons par paire « C5.vs.FA37 » et « FA5.vs.C37 ». Cependant, ces deux nouvelles comparaisons par

paire n'apportaient aucune information supplémentaire étant donné que les conditions de culture n'étaient pas comparables. En effet, il était inadéquat de faire des comparaisons et une interprétation lorsque aucun des facteurs (température ou acides gras) n'était comparable. Nous avons donc décidé d'exclure ces deux comparaisons et ne garder que les quatre comparaisons par paire « FA5.vs.C5 » ; « FA37.vs.C37 » ; « C5.vs.C37 » et « FA5.vs.FA37 ».

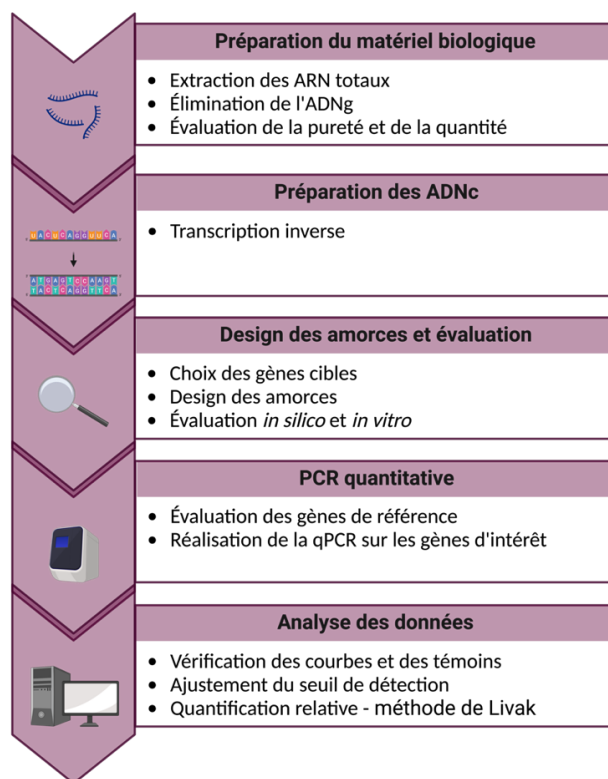
Enfin, nous avons pu observer sur le graphique de l'ACP la présence de deux réplicats biologiques semblent aberrants pour les conditions FA5 et FA37 (Figure 1-1). Nous avons donc refait la procédure d'analyse en excluant ces deux réplicats biologiques. Néanmoins, cette analyse ne s'est pas avérée concluante. En effet, sur la carte thermique représentant le profil d'expression des gènes différentiellement exprimés pour chaque réplicat biologique, nous avons observé que seulement un cluster de gènes dans chaque réplicat biologique était différent des autres (Figure 1-2). Retirer ces deux réplicats aurait engendré une perte d'informations. De plus, sur l'ACP, il était également possible de voir que les réplicats biologiques des cultures à 5°C sans supplémentation (C5) étaient différents entre eux (à cause des variabilités biologiques causées par une faible température), alors que l'ensemble des gènes différentiellement exprimés avait un profil d'expression homogène.



**Figure 1-2.** Évaluation des données de RNA-seq de *L. monocytogenes* Lm208 à 5°C et 37°C avec ou sans supplémentation en acide oléique (C18:1). « FA » et « C » font référence aux cultures de *L. monocytogenes* cultivées avec ou sans supplémentation en acides gras exogènes (#C18:1). « 5 » et « 37 » font référence à la température de culture. « Rx » fait référence au réplicat biologique. L'encadré noir fait référence aux clusters de gènes différents entre les trois réplicats biologiques.

En conclusion, nous avons décidé de garder l'ensemble des réplicats biologiques et analyser les quatre comparaisons par paire d'intérêts pour la suite de l'étude. Les scripts R qui ont permis les analyses sont disponibles en annexe (Annexe 4 et Annexe 5).

## 1.2 Optimisation de la méthode de RT-qPCR pour le suivi d'expression de gènes cibles



**Figure 1-3.** Workflow représentant les différentes étapes de travail effectuées dans cette étude pour quantifier l'expression de gènes cible par RT-qPCR. Figure créée avec BioRender.com.

### 1.2.1 Préparation du matériel biologique

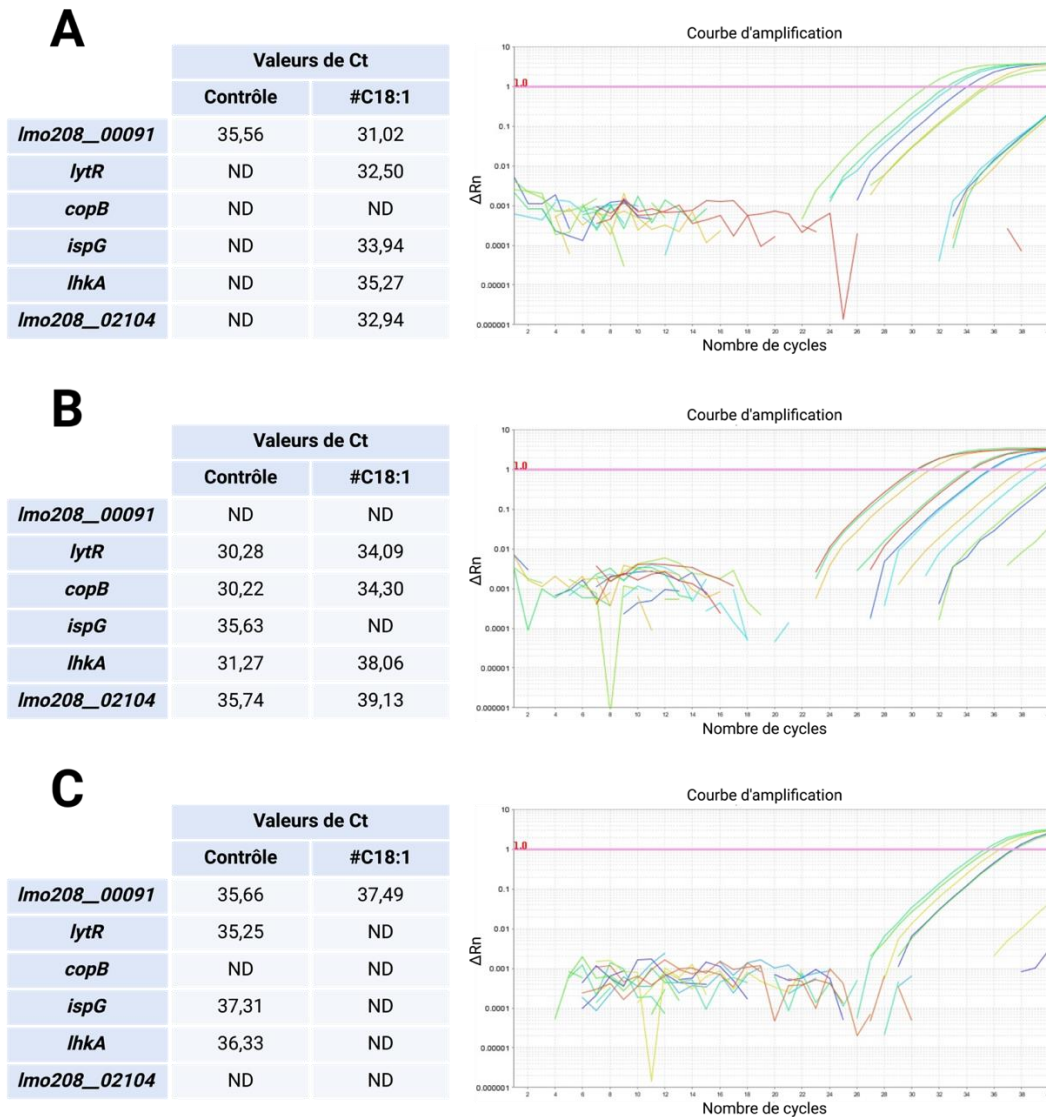
#### 1.2.1.1 Extraction des ARN totaux

La procédure de préparation des échantillons biologiques ainsi que l'extraction des ARN totaux et leur dosage de pureté / qualité est détaillée dans la partie suivante (Cf. Résultats expérimentaux, Partie 2 – II.2 ; 2.3). En bref, l'analyse ciblée du transcriptome (RT-qPCR) de *L. monocytogenes* a été réalisée à partir de quatre conditions de culture : sans (contrôle) ou avec supplémentation en acides gras exogènes (#C14, # C18:1 ou #C18:2) à 5°C. Les culots cellulaires ont été récupérés à trois temps de la phase de croissance (milieu de phase exponentielle, fin de phase exponentielle et début de phase stationnaire). L'extraction des ARN totaux a été effectuée par la méthode Trizol™.

### 1.2.1.2 Évaluation du traitement d'élimination de l'ADNg

À la suite de l'extraction des ARN totaux, l'échantillon subit un traitement DNaseI afin d'éliminer l'ADNg contaminant pouvant compromettre le bon déroulement de la qPCR et par conséquent, l'analyse des résultats. Ainsi, nous avons évalué l'efficacité de trois méthodes de traitement : (1) DNaseI 10 min à 37°C + Solution du kit 2 min à 42°C, (2) DNaseI 40 min à 37°C et (3) DNaseI 40 min à 37°C + Solution du kit 5 min à 42°C. La solution du kit faisait référence à la première étape du kit de transcription inverse. Le volume de DNaseI ajouté était identique aux trois traitements. En effet, l'ajout en unité d'enzyme n'était pas envisageable, car cela aurait impacté l'étape de purification des ARN et aurait pu dégrader l'échantillon.

L'évaluation de l'efficacité de traitement a été effectuée sur les échantillons ARN totaux de deux conditions de culture différentes, 5°C avec ou sans supplémentation en #C18:1, par analyse qPCR avec la technologie SYBR® Green sur six gènes en duplicat technique pour chaque condition. Nous avons considéré que le traitement d'élimination des ADNg était efficace lorsque aucune amplification n'était détectée (aucune valeur de  $C_T$ ), ou dans le cas contraire, le  $C_T$  devait être supérieur à 35. Concernant le traitement n°1, des valeurs de  $C_T$  de 31,02 ; 32,50 et 32,94 ont été détectées pour les gènes *Imo208\_00091*, *lytR* et *Imo208\_02104*, respectivement (Figure 1-4.A). À propos du traitement n°2, des valeurs de  $C_T$  inférieures à 35 étaient également détectées (Figure 1-4.B). Ces deux traitements n'étaient donc pas suffisamment efficaces pour éliminer l'ADNg. En revanche, pour le traitement n°3, lorsqu'une amplification était détectée, le  $C_T$  était supérieur à 35 (Figure 1-4.C). Ce dernier traitement était efficace pour l'élimination de l'ADNg, et a été appliqué à l'ensemble des échantillons.



**Figure 1-4.** Impact de différents traitements en vue de l'élimination de l'ADNg dans les échantillons d'ARN totaux dans le but de faire une quantification de l'expression par qPCR. (A) Traitement DNaseI 10 min à 37°C + Solution du kit 2 min à 42°C, (B) Traitement DNaseI 40 min à 37°C et (C) DNaseI 40 min à 37°C + Solution du kit 5 min à 42°C.

### 1.2.2 Design et évaluation *in silico* et *in vitro* des amorces

Nous avons conçu les amorces avec l'outil Primer-Blast disponible sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Ye et al., 2012), dont les paramètres suivants ont été appliqués : une amplification dans le premier tiers du gène, une longueur d'amplicon entre 100 pb et 120 pb et une température d'hybridation des amorces entre 57°C et 63°C avec un optimum à 60°C de manière à pouvoir utiliser le même programme qPCR pour l'ensemble des gènes. De plus, les options « Use

*Thermodynamic Oligo Alignment*» et « *Use Thermodynamic Template Alignment* » ont été appliquées, afin d'éviter que les amorces ne forment des épingle à cheveux et/ou des dimères et qu'elles ne s'alignent sur d'autres régions non désirées dans le génome de *L. monocytogenes*. Ensuite, nous avons évalué *in silico* et *in vitro* chaque couple d'amorces d'après une procédure adaptée de Desriac et al. (2018).

### 1.2.2.1 Évaluation *in silico* des couples d'amorces

La spécificité de séquence du couple d'amorces a été testée à l'aide de l'outil web « *in silico* PCR amplification » (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) (Bikandi et al., 2004) et comparée à l'ensemble du génome de la souche Lm208 ainsi qu'à l'ensemble des génomes du genre *Listeria* disponibles dans la base de données. Les paramètres par défaut ont été utilisés. Les couples d'amorces étaient révisés lorsque ceux-ci présentaient une hybridation sur une région non désirée ou si la taille de l'amplicon n'était pas celle attendue.

L'absence des structures secondaires stables au sein des amorces a été vérifiée à l'aide de l'outil Beacon Designer™ free edition (Premier Biosoft International, Palo Alto, California, USA, <https://www.premierbiosoft.com/qpcr/>) en calculant l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de l'épingle à cheveux, de l'homodimère et de l'hétérodimère avec les paramètres par défaut. Les amorces ayant une structure stable ont été rejetées sur la base des valeurs de  $\Delta G$  conseillées dans la note technique du logiciel. En bref, une épingle à cheveux à l'extrémité 3' avec un  $\Delta G$  de -2 kcal/mol et/ou une épingle à cheveux interne avec un  $\Delta G$  de -3 kcal/mol ont été tolérées et un homo- ou hétéro- dimère à l'extrémité 3' avec un  $\Delta G$  de -5 kcal/mol et/ou un homo- ou hétéro- dimère interne avec un  $\Delta G$  de -6 kcal/mol ont été tolérés. Les amorces présentant une structure secondaire stable pouvant perturber leur hybridation sur la séquence cible ont été rejetées sur la base des valeurs de  $\Delta G$  décrits ci-dessus.



Les structures de repliement de l'amplicon ont été analysées en utilisant l'outil web UNAFold disponible sur le site de IDT Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/UNAFold>) avec les paramètres suivants : 50 mM et 3 mM de Na<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, respectivement et une température de 60°C (en accord avec les concentrations de qPCR).

La formation d'une structure secondaire de l'amplicon peut impacter l'hybridation des amorces lors du cycle suivant malgré une étape de dénaturation (Bustin et al., 2009). Si le  $\Delta G$  est élevé, un apport d'énergie est nécessaire pour la formation d'une structure secondaire, au contraire, si le  $\Delta G$  est négatif, aucun apport d'énergie n'est nécessaire et il faudra un apport d'énergie conséquent pour défaire cette structure secondaire (Campbell et al., 2012). Si le  $\Delta G$  est proche de 0, la probabilité de formation d'une structure secondaire est très faible (Campbell et al., 2012). Dans notre étude, si la température de formation de la structure était proche de celle utilisée dans le programme de qPCR et si le  $\Delta G$  était négatif, alors le couple d'amorces était réétudié et réévalué afin que l'hybridation des amorces ne soit pas impactée par les structures secondaires.

#### 1.2.2.2 Évaluation in vitro des couples d'amorces

La spécificité des amorces a été évaluée en effectuant une qPCR sans matrice (NTC *No Template Control*) avec la technologie SYBR® Green. Par conséquent, aucun C<sub>T</sub> ne devait être généré ou dans le cas contraire, celui-ci devait être supérieur à un seuil défini (ici, nous avons considéré que le seuil était C<sub>T</sub> = 33) (Nolan et al., 2006). Les courbes de fusion ou *melt curve* résultantes ont également été analysées. En effet, selon le profil de la courbe de fusion, cela donne des indications sur l'éventuelle formation d'un dimère des amorces ou d'une amplification non-spécifique (Nolan et al., 2006).

L'efficacité du couple d'amorces, notée  $\epsilon$ , a été évaluée en effectuant une réaction qPCR avec la technologie SYBR® Green sur une série de dilutions de l'ADNg extrait de Lm208. Cinq concentrations d'ADNg ont été utilisées (64 ; 32 ; 16 ; 8 ;

1,6 ng/ $\mu$ L). L'évaluation de l'efficacité a été réalisée deux fois avec des dilutions d'ADNg indépendantes. Les valeurs de E ont été calculées d'après la méthode décrite par Pfaffl (2001), soit :

$$\epsilon = 10^{(-1/\text{pente})}$$

Seuls les couples d'amorces dont l'efficacité était supérieure à 1,8 ont été conservés.

L'ensemble des résultats de l'évaluation *in silico* et *in vitro* de chaque couple d'amorces est présenté dans le tableau suivant (Tableau 1-1).

**Tableau 1-1.** Bilan de l'évaluation *in silico* et *in vitro* des couples d'amorces de l'ensemble des gènes

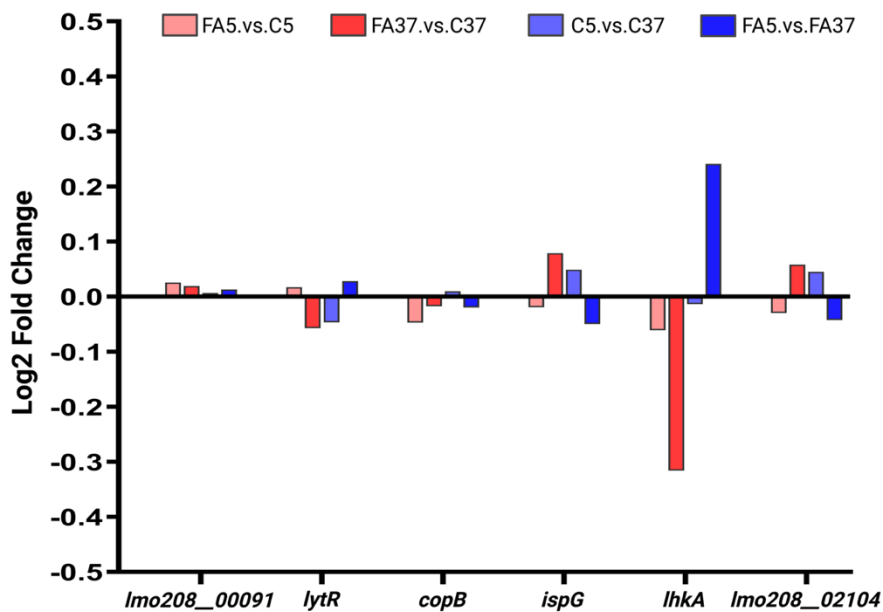
N° de gène Lm208	N° du gène EGD-e	Nom du gène	Produit du gène	Amorces de 5' vers 3'	Taille de l'amplicon (bp)	Spécificité du couple	Impact de la structure secondaire des amorces	Impact de la structure secondaire de l'amplicon	ε	M
<i>Lmo208_00091</i>	<i>Imo0268</i>	ND	phosphoglycérate mutase	F - CTGGACAAATGCAAGGATGGG R - AACGGCATCAATCTGCATGTC	104	Oui	Non	Non	2,114	0,180
<i>Lmo208_00857</i>	<i>Imo1026</i>	<i>lytR</i>	Protéine LytR	F - TACTCATGGGTTTCAGATGCCC R - TACTCATGGGTTTCAGATGCCC	100	Oui	Non	Non	2,034	0,320
<i>Lmo208_00960</i>	<i>Imo1147</i>	<i>copB</i>	Protéine impliquée dans la biosynthèse de la cobalamine	F - AGCGGTAAGAGTAGCTTTGCT R - AGCGGTAAGAGTAGCTTTGCT	107	Oui	Non	Non	1,962	0,285
<i>Lmo208_01258</i>	<i>Imo1441</i>	<i>ispG</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	F - TGTCGAAGCAACAGTAGCAGA R - GCACTAAGAGCATTGCTGC	102	Oui	Non	Non	1,999	0,170
<i>Lmo208_01325</i>	<i>Imo1508</i>	<i>lhcA</i>	histidine kinase	F - ATTCGCCACAAGATGCAACG R - TGGTTTCGTCTGGCATTTC	102	Oui	Non	Non	2,033	0,440
<i>Lmo208_02104</i>	<i>Imo2262</i>	ND	Protéine hypothétique	F - TGGCTATTTACTTGCGCAACG R - TGTAGCCTGGTCTTCCGGAT	100	Oui	Non	Non	2,064	0,159
<i>Lmo208_00517</i>	<i>Imo0691</i>	<i>cheY</i>	Régulateur de réponse du chimiotactisme	F - GCGGAAAATGGACTGGAAGC R - CGCAAGTGCTTCTAAGCCATC	105	Oui	Non	Non	1,978	ND
<i>Lmo208_00516</i>	<i>Imo0690</i>	<i>flaA</i>	Flagelline	F - TGATGACGCTGCTGGTCTTG R - GAGCTGAATCCGCTGTTTGT	119	Oui	Non	Non	1,989	ND
<i>Lmo208_02015</i>	<i>Imo2172</i>	<i>pct</i>	Propionate CoA transférase	F - GGGCTCCGCGTAATCTTACA R - GCAATCCACCAATCCAGCG	115	Oui	Non	Non	1,898	ND
<i>Lmo208_02013</i>	<i>Imo2170</i>	<i>fabK</i>	Enoyl-ACP-réductase	F - TACAAGGGGCAATGGCACAA R - TGTCTGCTGACATTCCACCA	102	Oui	Non	Non	2,002	ND
<i>Lmo208_02018</i>	<i>Imo2175</i>	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP-réductase	F - GGCACAAAAGTAGTAGTGGC R - TACATTAGCTGCGACGGCAA	105	Oui	Non	Non	1,918	ND
<i>Lmo208_01850</i>	<i>Imo2016</i>	<i>cspB</i>	Protéine de choc froid	F - AGGCTTCGGTTTCATCGAAGT R - TCAACGCTTTGACCTTCGTCT	105	Oui	Non	Non	2,167	ND
<i>Lmo208_02361</i>	<i>Imo2515</i>	<i>degU</i>	Régulateur orphelin DegU	F - GGTCTGAGCGGAAGCTGAAA R - AGTCCGTTCCAGTTGGCAT	105	Oui	Non	Non	2,021	ND
<i>Lmo208_00193</i>	<i>Imo0362</i>	<i>tatA</i>	Protéine du système de translocation Tat	F - GCTTTAATTGTCGGAGCCGC R - CATCATGCCTTTGGTCGCAT	114	Oui	Non	Non	1,908	ND
<i>Lmo208_02856</i>	<i>Imo0152</i>	<i>dppE</i>	Di-peptide ABC transporteur	F - TTGTTCTGGGGTTGCTGAC R - CTTGGGAACCATCGGACCAT	102	Oui	Non	Non	2,030	ND

ND – non déterminé    ε efficacité du couple d'amorce    M valeur de stabilité du gène

### 1.2.3 Choix des gènes de référence et évaluation de leur stabilité

Le gène de référence est une cible dont la quantité ne varie pas au cours de l'expérience, quelle que soit la condition testée. Ce dernier permet de quantifier le niveau d'expression d'un gène d'intérêt dans une condition donnée. Dans la littérature, les gènes de référence choisis sont en lien avec le métabolisme central de la cellule bactérienne ou avec la réplication de l'ADN (Tasara and Stephan, 2007). Dans un modèle d'adaptation au stress froid, les gènes de référence conseillés sont les suivants, de l'expression la plus stable à la moins stable : *ARNr 16S* > *gap* > *bgIA* > *rpoB* > *rplD* (Tasara and Stephan, 2007). Cependant, même si l'utilisation du gène de l'*ARNr 16S* était recommandée pour une situation de stress froid, et que celui-ci a été utilisé dans plusieurs études (Chan et al., 2007; Rantsiou et al., 2008; Schmid et al., 2009), nous avons écarté le gène de l'*ARNr 16S* en tant que gène de référence potentiel. En effet, ce gène peut être présent en multi-copies dans la cellule bactérienne, ce qui peut influencer l'analyse des résultats de RT-qPCR, en particulier si les différences d'expression des gènes d'intérêt sont subtiles dans les différentes conditions de culture testées (Vandesompele et al., 2002). Aujourd'hui, avec le développement de la transcriptomique, il est possible de choisir plus facilement les gènes de référence (Hingston et al., 2017).

Pour cette étude, les gènes de référence ont été choisis selon leur profil d'expression dans les quatre comparaisons par paire de l'analyse globale du transcriptome. Les six gènes présentant le moins de variation possible ont été sélectionnés en tant que gène de référence potentiel : *Imo208\_00091*, *lytR*, *copB*, *ispG*, *lhkA* et *Imo208\_02104* (Figure 1-5). Le gène *lhkA* est un des neuf gènes de référence utilisés dans les analyses de typage Multi Locus Sequence Typing (MLST) chez *L. monocytogenes* (Salcedo et al., 2003).



**Figure 1-5.** Profils d'expression des six gènes de référence potentiels chez *L. monocytogenes*. « FA » et « C » font référence aux cultures de *L. monocytogenes* Lm208 cultivées avec ou sans supplémentation en acides gras exogènes (#C18:1). « 5 » et « 37 » font référence à la température de culture.

La stabilité des six gènes, candidats potentiels en tant que gène de référence, a été évaluée. En effet, bien que les gènes sélectionnés ne présentaient pas de variabilité d'expression en analyse transcriptomique, il était essentiel d'évaluer leur stabilité dans les différentes conditions de RT-qPCR.

La stabilité des gènes de référence a été évaluée selon la méthode décrite par Vandesompele et al. (2002) et en utilisant le module geNorm intégré dans le logiciel qBase+ par Biogazelle (Hellemans et al., 2007) (<https://genorm.cmgg.be/> ; <https://www.qbaseplus.com/>). Deux réplicats biologiques ont été réalisés. Les moyennes arithmétiques des  $C_T$  bruts des duplicata techniques ont été calculées pour chaque échantillon et pour chaque gène, puis importées dans le logiciel qBase+ pour l'analyse geNorm. Les résultats fournis se décomposaient en trois parties. D'une part, une valeur de stabilité, notée M, a été calculée permettant ainsi le classement des gènes du moins stable au plus stable. Plus la valeur de M est petite, plus le gène est stable et réciproquement. En dessous d'une valeur de M de 0,5, le gène est considéré comme stable (Hellemans et al., 2007). D'autre part, une valeur de variation, notée V, a été

calculée en vue de déterminer le nombre optimal de gènes de référence à utiliser dans les analyses ultérieures. Enfin, une interprétation automatique des résultats a été générée.

Les valeurs de M obtenues sont présentées dans le tableau précédent (Tableau 1-1). Les conclusions du logiciel geNorm conseillaient l'utilisation de deux gènes de référence : *ispG* et *Imo208\_02104*. Les premières analyses de données de qPCR ont révélé que quel que soit le gène de référence choisi, les résultats de quantification relative étaient identiques. Par conséquent, les analyses de données de qPCR n'ont été effectuées qu'avec le gène *Imo208\_02104* (valeur de M la plus basse).

#### 1.2.4 Analyse des données de RT-qPCR

Dans un premier temps, les courbes d'amplification et de fusion de chaque échantillon ont été observées afin de vérifier la présence d'une amplification et l'absence d'un épaulement ou double pic signifiant une amplification. Puis, la valeur de seuil a été déterminée et fixée à 1. Cette valeur a été définie à l'issue de l'ensemble des manipulations qPCR et d'après l'ensemble des tracés d'amplification, afin que cette valeur soit représentative pour l'ensemble des gènes. Dans un second temps, les valeurs brutes de  $C_T$  ont été extraites et examinées. Lorsque l'écart de  $C_T$  entre les duplicat techniques était supérieur à 1, celles-ci ont été exclues de l'étude. Enfin, les valeurs de  $C_T$  ont été exprimées en quantité relative par rapport à la condition témoin à chaque phase de croissance correspondante en utilisant la méthode de Livak (Livak and Schmittgen, 2001). Des tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad (version 10.1.2, Prism, USA), afin de savoir si les expressions relatives de chaque gène étaient significativement différentes entre deux conditions.

## II.2. Article – “Deciphering the impact of exogenous fatty acids on *Listeria monocytogenes* at low temperature by transcriptome analysis”

---

Publication acceptée dans *Frontiers in Microbiology*  
doi: 10.3389/fmicb.2024.1441784

Aurore QUILLERÉ<sup>1</sup>, Maud DARSONVAL<sup>1</sup>, Angelos PAPADOCHRISTOPOULOS<sup>1</sup>,  
Alban AMOROS<sup>1</sup>, Pierre NICOLAS<sup>2</sup>, Florence DUBOIS-BRISSONNET<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350, Jouy-en-Josas, France

### 2.1 Abstract & Keywords

*Listeria monocytogenes* is a ubiquitous and psychrotrophic foodborne pathogen commonly found in raw materials, ready-to-eat products, and food environments. We previously demonstrated that *L. monocytogenes* can grow faster at low temperature when unsaturated fatty acids (UFA) are present in its environment. This could question the maintenance of food safety for refrigerated foods, especially those reformulated with a higher ratio of UFA versus saturated fatty acids (SFA) to fit with nutritional recommendations. In this study, we used transcriptomics to understand the impact of UFA on the behavior of *L. monocytogenes* at low temperature. We first demonstrated that *fabK*, a key gene in SFA synthesis, is up-regulated in the presence of UFA but not SFA at low temperature. *L. monocytogenes* can thus regulate the synthesis of SFA in its membrane according to the type of FA available in its environment. Interestingly, we also observed up-regulation of genes involved in chemotaxis and flagellar assembly (especially *cheY* and *flaA*) in the presence of UFA but not SFA at low temperature. TEM observations confirmed that *L. monocytogenes* acquired a remarkable phenotype with numerous and long-looped flagella only in the presence of UFA at 5°C but not at 37°C. As flagella are well known to be involved in

biofilm formation, this new finding raises questions about the structure and persistence of biofilms settled in refrigerated environments using unsaturated lipid-rich products.

**Keywords:** foodborne pathogen, refrigeration, exogenous fatty acids, fatty acid membrane composition, transcriptomics, RT-qPCR, flagella, *cheY* gene

## 2.2 Introduction

Listeriosis, caused by the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, is the fifth most reported zoonosis and has a high fatality rate (13.7% in Europe, in 2021) (EFSA Journal, 2022). *L. monocytogenes* is ubiquitous and can be found in a wide variety of foodstuffs, widely present in food-associated environments (raw materials, food chain, and retail environments) leading to a high prevalence of this bacterium in foodstuffs. Ready-to-eat (RTE) products are consumed without cooking or other processing that could remove or reduce pathogens to acceptable levels (EFSA Journal, 2022). For this food category, which can support the growth of *L. monocytogenes*, EC Regulation no. 2073/2005 established that no more than 100 CFU/g should be found in 5 samples at the end of shelf-life. During shelf-life, *L. monocytogenes* growth is mainly controlled by refrigeration temperature.

The cold adaptation response is a common mechanism, well-described in psychrotrophic bacteria such as *Bacillus cereus* and *L. monocytogenes* (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Low temperature directly impacts cell integrity and basal cell functions including membrane fluidity, nutrient uptakes, protein folding and assembly of macromolecules (Zhu et al., 2005; Tasara and Stephan, 2006). The cold-related loss of membrane fluidity is due to a membrane phase transition from liquid-crystalline to gel state (Denich et al., 2003). The first transient adaptive response to low temperature is the regulation of the fatty-acid synthesis type II (FASII) for increasing the proportion of FA with lower melting points into the phospholipids and restoring optimal membrane fluidity (Annous et al., 1997).



The FA composition of *L. monocytogenes* mainly consists of *iso*- or *anteiso*-branched fatty acids (*i*-BFA and *a*-BFA) (84% of the membrane FA at 37°C in TSB) (Touche et al., 2023). BFA are produced from valine (*i*-C14, *i*-C15), leucine (*i*-C15, *i*-C17), and isoleucine (*a*-C15, *a*-C17) by transamination and decarboxylation to form acyl-CoA derivatives that enter then in the elongation module (Zheng et al., 2005). The FA profile of *L. monocytogenes* also contains saturated (SFA) and unsaturated (UFA) fatty acids at smaller proportions (13% and 3%, respectively at 37°C in TSB) (Touche et al., 2023). SFA are produced from acetate through the initiation and elongation modules (Figure 2-4.A). Although the presence of UFA in its membrane was previously described, as was the increase of their proportion when temperature decreases, the pathway of UFA synthesis has not been yet identified (Hingston et al., 2017; Touche et al., 2023). Two pathways for UFA synthesis are described in other bacterial species: (1) *de novo* synthesis through the *fabM* or *fabN* pathway; or (2) desaturation of an acyl chain through desaturase activity. As far as we know, none of them have been described in *L. monocytogenes*. The FabM or FabN pathway, described respectively in *Streptococcus spp.* and *Enterococcus faecalis*, converts *trans*-2-enoyl-ACP into acyl-ACP with a double bond leading to UFA synthesis (Dong and Cronan, 2022; Fujita et al., 2007). This FabM/N pathway enters in competition with the FabK pathway leading to SFA synthesis. The regulation between these two pathways modulates the SFA/UFA ratio and thus membrane fluidity. Therefore, if this pathway exists in *L. monocytogenes*, the bacteria could sustain optimum membrane fluidity by modulating the ratio UFA/SFA, besides the classical modulations of the membrane fluidity in Gram-positive bacteria (ratios of BFA/SFA, *a*-BFA/*i*-BFA, length of the FA acyl chain (Annous et al., 1997; Tasara and Stephan, 2006).

Moreover, *L. monocytogenes* was recently shown to incorporate exogenous FA (#FA) into its membrane (Flegler et al., 2022; Touche et al., 2023). Direct incorporation of #FA could save the energy cost of *de novo* FA synthesis. Touche et al. (2023) showed that the incorporation of #FA into the membrane of *L. monocytogenes* is temperature-dependent but non-selective. All #FA are highly incorporated into the

membrane at low temperature, but not at 37°C, and the effect on bacterial growth depends on the type of FA: #UFA promote and #SFA inhibit bacterial growth. This phenomenon is of major importance in terms of food safety. Indeed, today's nutritional and health challenges are to reduce the ratio of SFA/UFA in the consumers' diet. Consequently, food operators tend to follow these recommendations and reformulate their products in this way in the last twenty years. However, the increase of UFA in refrigerated foods can favor the growth of *L. monocytogenes* and can compromise food safety before the end of shelf-life (Touche et al., 2023).

The mechanisms of FA incorporation and its effects on general metabolism are still unknown. Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp., can incorporate #FA through a FakAB system working as a two-component system (TCS). FakA, a FA kinase, phosphorylates FakB, the FA-binding protein, which in turn transfers the phosphate to the FA. The resulting acyl-phosphate is then transferred to acyl-carrier protein (ACP) by PlsX, the acyltransferase (Parsons et al., 2014). Different FakB chains with differences in selectivity have been described: FakB1 exclusively binds SFA, FakB2 binds SFA and mono-UFA, and FakB3 binds poly-UFA (Gullett et al., 2019). As far as we know, this mechanism is still not described in *L. monocytogenes*.

In this study, we first analyzed the global transcriptome of *L. monocytogenes* at 5°C and 37°C with or without oleic acid to identify the genes associated with the observed impact of UFA on *Listeria monocytogenes* grown at low temperature (RNA-seq). Targeted transcriptomic analysis (RT-qPCR) and phenotypic characterizations (FA membrane profiles and TEM observations) were then conducted with different types of #FA and at different growth phase points to further decipher the impact of #FA on the metabolism and behavior of *L. monocytogenes* at low temperature.

## 2.3 Materials and Methods

### 2.3.1 Bacterial strain and culture conditions

*Listeria monocytogenes* CNL895805, shortly named Lm208, used in this study was isolated from sheep brain in France (serotype 1/2a, CC7, BioSample SAMN39851069) (Tabouret et al., 1992; Touche et al., 2023; Van Langendonck et al., 1998). This strain was chosen among nine *Listeria monocytogenes* strains of different origins because of its highest overgrowth capabilities in the presence of #UFA at low temperature (Touche et al., 2023). It was stored in Tryptone Soy Broth (TSB, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) supplemented with 20% (v/v) glycerol at -80°C (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The strain was inoculated at 1% v/v in TSB ( $\approx 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>) with a standardized inoculum obtained after two successive subcultures at 30°C without shaking. When indicated, the medium was supplemented with different #FA, namely myristic acid (#C14), oleic acid (#C18:1), and linoleic acid (#C18:2) (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden). These #FA solutions were prepared as previously described (Touche et al., 2023) and the final FA concentration in the culture medium was 0.045 mM FA in 0.05% bovine serum albumin (w/v) (BSA, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For RNA sequencing, *L. monocytogenes* was grown with #C18:1 or without and incubated at 5°C or 37°C. For RT-qPCR, membrane FA analysis, and TEM observations, *L. monocytogenes* was grown with #C14, #C18:1, #C18:2 or without at 5°C.

### 2.3.2 Cell harvest at different time points

Bacterial growth was followed by measuring optical density (OD) at 600 nm (Genesis 30 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) and cells were harvested at different time points: the mid-exponential phase at  $OD_{600} = 0.1 \pm 0.05$  (T1), the end of the exponential phase at  $OD_{600} = 0.4 \pm 0.05$  (T2) and the beginning of the stationary phase at  $OD_{600} = 0.7 \pm 0.05$  (T3). Cells were harvested at T1 for RNA sequencing and at T1, T2, and T3 for RT-qPCR and TEM observations. The harvested volume was adjusted to collect  $10^9$  cells (100 mL for T1, 10 mL for T2,

and 5 mL for T3). For RNA extraction, cells were harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 2 min at the temperature of the culture when the target OD<sub>600</sub> was reached. The pellet was then immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C before extraction. For TEM observations, cells were harvested by centrifugation at 3000 rpm for 10 min to preserve cell integrity and fixed immediately.

### 2.3.3 RNA extraction

Total RNA was extracted by the Trizol™ reagent method (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) with some adaptations (Toledo-Arana et al., 2009). Pellets were resuspended in 1 mL of Trizol™ and transferred into a screw-cap tube containing 0-50 µm glass beads for cell disruption by bead beating for 40 sec at 6 m/s (FastPrep-24 instrument, MP Biomedicals, Illkirch, France). RNA contained in the upper aqueous phase was washed with chloroform, precipitated with cold isopropanol, and finally washed twice with 75% ethanol (Sigma-Aldrich). The RNA pellet was dried for 30 sec at 63°C and resuspended in 20 µL of nuclease-free water (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Total RNA was treated by DNaseI and purified using the Monarch® RNA Cleanup kit (New England Biolabs® Inc., Evry-Courcouronnes, France). Before RNA sequencing and RT-qPCR, Nanodrop (2000 NanoDrop™ spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) and Qubit™ (Qubit™ 3 Fluorometer with the Qubit™ RNA HS assay kit, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), respectively, were used to quantify RNA. Samples with a concentration above 10 ng/µL were used. RNA quality was assessed with a BioAnalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer System with RNA 6000 Nano kit, Agilent, Santa Clara, USA) and Nanodrop (2000 NanoDrop™ spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Samples with an RNA Integrity Number (RIN) above 7.5 were used for RNA sequencing. Samples with A<sub>260/280</sub> and A<sub>260/230</sub> ratios above 2.0 and 1.8, respectively, were used for the RT-qPCR. Three to six biological replicates were performed for each of the conditions.

### 2.3.4 RNA sequencing and data analysis

RNA sequencing was performed by the I2BC platform (Paris-Saclay University, Gif-sur-Yvette, France, <https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>) on an Illumina NextSeq sequencer NS500446. Primary data processing was performed by the I2BC platform with the following data analysis pipeline: demultiplexing (with bcl2fastq2 v.2.18.12), adapter trimming (with Cutadapt v.1.15), quality control (with FastQC v.0.11.5) resulting in 20M to 34M reads per sample, post QC and trimming. Reads were mapped to the Lm208 genome (BioProject PRJNA1074122, SRR29855365) using the BWA 0.6.2-r126. This generated between 8M and 13M uniquely mapped reads per sample. Mapping efficiency ranged from 77.86 to 84.34% for individual reads. FeatureCounts (v.1.5.2) was used to assign sequence reads to genomic features. The downstream data was analyzed using the R programming language with the Rstudio interface (v.4.1.2) and R package DESeq2 (v.1.30.1) (Love et al., 2014) based on the raw counts provided by the I2BC platform. First, 83 genes with fewer than 10 counts in the three biological replicates were excluded. Then, raw counts were normalized according to gene length and the total number of mapped reads by calculating FPKM (Fragments per Kilobase per Million Mapped reads) using the library-size estimation method implemented in R package DESeq2 (v.1.30.1) (Love et al., 2014). These FPKM values were used as expression level values for each gene in each condition. To assess the overall reproducibility, normalized counts of samples ( $\log_2(\text{fpkm}+5)$ ) were compared by computing pairwise Pearson coefficients ( $r$ ) and distances ( $1-r$ ). The distances were computed by average-linkage clustering using the "hclust" function (v.3.6.2) and summarized by an ascending hierarchical classification.

### 2.3.5 Clustering of gene expression profile

To detect differentially expressed genes (DEG) between pairs of conditions,  $\log_2$  fold-change ( $\log_2\text{FC}$ ) and p-values ( $p$ ) were calculated using DESeq2. Four pairwise comparisons were considered: "FA5.vs.C5"; "FA37.vs.C37"; "C5.vs.C37"; "FA5.vs.FA37" where "FA" and "C" refer to the conditions with #C18:1 or without (control),

respectively, and "5" and "37" refer to the culture temperature in °C. To control the false discovery rate of each pairwise comparison, the R package "fdrtool" (v.1.2.17) (Strimmer, 2008) with the vector of p-values was used to estimate q-values (q). The DEG reported for the four pairwise comparisons were based on a q-value  $\leq 0.05$  and  $|\log_2FC| \geq 1$ . The expression profiles of the DEG across all samples were compared by computing pairwise Pearson distances (on  $\log_2(\text{fpkm}+5)$ ) and subjected to average-link hierarchical classification with "hclust" function (v.3.6.2).

Clusters of DE genes, called DE no. (1 to 35), were defined by cutting the hierarchical clustering tree at a Pearson distance of 0.3 (average Pearson correlation above 0.7). Clusters were labeled according to their size, DE1 being the largest cluster. The resulting dendrogram and heatmap were produced with the "heatmap.2" function included in the R package "gplots" (v.3.1.1), using a specific color palette with red for up-regulated genes ( $q \leq 0.05$  and  $\log_2FC \geq 1$ ) and blue for down-regulated genes ( $q \leq 0.05$  and  $\log_2FC \leq -1$ ). The whole transcriptomic dataset has been deposited in GEO (accession number GSE268246).

### 2.3.6 Functional categorization of differentially expressed genes

Functional categories were assigned to the genes of DE clusters using the Listeriomics database (Bécavin et al., 2017) and the SmartTables tool based on the BioCyc database (<https://biocyc.org/>) (Caspi et al., 2016) with *Listeria monocytogenes* EGD-e genome as a reference. For each DE cluster, the percentage of functional categories was calculated and is summarized in Table S.2-1.

**Table S.2-1.** Functional category distribution for each gene expression cluster. Gene expression clusters are named from DE1 to DE12 by decreasing size and contain more than 10 genes. Functional categories are derived from the Listeriomics database. Some genes are involved in several functional categories, which is why the sum of percentages may exceed 100%.

Functional categories	DE1	DE2	DE3	DE4	DE5	DE6	DE7	DE8	DE9	DE10	DE11	DE12
Amino acid transport and metabolism	6.63	16.67	5.19	0.00	3.13	0.00	6.90	13.33	46.67	0.00	7.69	18.18
Carbohydrate transport and metabolism	13.79	10.26	14.29	2.90	6.25	0.00	6.90	26.67	0.00	0.00	46.15	18.18
Cell cycle control, mitosis and meiosis	1.33	0.32	0.00	2.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cell motility	1.06	0.32	0.00	1.45	56.25	3.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cell wall/membrane biogenesis	4.77	1.28	6.49	14.49	0.00	3.23	10.34	0.00	0.00	0.00	7.69	0.00
Coenzyme transport and metabolism	1.33	2.88	2.60	5.80	0.00	0.00	10.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Defense/virulence mechanisms	2.65	2.56	1.30	7.25	0.00	0.00	6.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Energy production and conversion	4.51	1.60	7.79	2.90	0.00	0.00	3.45	0.00	33.33	0.00	7.69	18.18
General function prediction only	12.20	16.03	15.58	8.70	9.38	3.23	0.00	20.00	0.00	0.00	15.38	18.18
Inorganic ion transport and metabolism	5.31	4.49	5.19	30.43	3.13	0.00	3.45	13.33	0.00	0.00	0.00	36.36
Intracellular trafficking and secretion	1.06	0.32	1.30	4.35	15.63	0.00	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lipid transport and metabolism	0.53	0.32	1.30	2.90	0.00	0.00	0.00	13.33	0.00	0.00	0.00	0.00
Nucleotide transport and metabolism	5.04	0.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	4.24	1.60	1.30	4.35	3.13	0.00	3.45	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
Replication, recombination and repair	3.45	2.24	0.00	0.00	0.00	0.00	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	1.59	1.60	3.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	7.69	0.00
Signal transduction mechanisms	3.98	4.81	9.09	1.45	18.75	3.23	0.00	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
Transcription	8.75	13.46	5.19	2.90	3.13	3.23	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Translation	4.24	2.24	1.30	0.00	0.00	3.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Function unknown / Not in COGs / NA	26.79	31.41	33.77	20.29	25.00	80.65	44.83	20.00	13.33	100.00	23.08	27.27

### 2.3.7 RT-qPCR and data analysis

Primers were designed using Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Table 2-1) with the following settings: a PCR amplicon size between 100 and 120 pb in the first third of the coding sequence, a melting temperature between 57.0 and 63.0°C with an optimum of 60°C and a difference of 3°C. Primer pair efficiency was assessed by performing the qPCR reaction on serial dilutions of gDNA extracted from Lm208 (64; 32; 16; 8 and 1.6 ng/μL). The efficiency was assessed twice with independent gDNA dilutions and calculated as described by Pfaffl (2001). Primer pairs with an efficiency above 1.8 were selected for RT-qPCR. The reference gene was chosen among six genes selected for their stable expression in all conditions of the transcriptomic analysis and tested for stability in RT-qPCR. Stability was assessed twice with or without different #FA (#C14, #C18:1, or #C18:2) at 5°C by calculating a stability M value using the geNorm module integrated in the qbase+ software (v.3.4). The smaller the M value (below 0.5) the greater the gene stability: *Imo208\_02104* (*Imo2262* in *L. monocytogenes* EGD-e, hypothetical protein), which had the smallest M value (M = 0.120 and 0.157 for the two replicates), was selected as reference gene (Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2007). For each sample, 1 μg of total RNA was reverse transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) to obtain cDNA. cDNA was diluted at 1:10 and qPCR was conducted in a StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) using SsoAdvanced™ Universal SYBR Green® Supermix (BioRad, Hercules, USA) with 250 nM for each primer. The transcript levels of genes of interest were normalized to the mean of the transcript levels of *Imo208\_02104* (reference gene) in all conditions. The relative expression was calculated using the comparative  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method by calculating  $\Delta C_T$  and  $\Delta\Delta C_T$  according to the two formulas below (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\Delta C_T = C_{T_{gene\ of\ interest}} - C_{T_{reference\ gene}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{\#FA}} - \Delta C_{T_{control}}$$



The relative expression levels of each gene in the different conditions with #C14, #C18:1, or #C18:2 were compared to the control without #FA at each time point. The control is fixed to a relative expression level of 1.

**Table 2-1.** Primers used for quantitative PCR

Lm208 locus tag	Gene name	Product	Primers 5' → 3'		Amplicon size (bp)	Efficiency
<i>Imo208_02104</i>	NA*	Hypothetical protein	F	TGGCTATTTACTTGGCGCAACG	100	2.064
			R	TGTAGCCTGGTCTTCCGGAT		
<i>Imo208_00517</i>	<i>cheY</i>	Chemotaxis response regulator	F	GCGGAAAATGGACTGGAAGC	105	1.978
			R	CGCAAGTGCTTCTAAGCCATC		
<i>Imo208_00516</i>	<i>flaA</i>	Flagellin	F	TGATGACGCTGCTGGTCTTG	119	1.989
			R	GAGCTGAATCCGCTGTTTGT		
<i>Imo208_02013</i>	<i>fabK2</i>	Enoyl-ACP-reductase	F	TACAAGGGGCAATGGCACAA	102	2.002
			R	TGTCTGCTGACATTCCACCA		
<i>Imo208_02015</i>	<i>pct</i>	Propionate CoA transferase	F	GGGCTCCGCGTAATCTTACA	115	1.898
			R	GCAATCCACCAATCCAGCG		
<i>Imo208_02018</i>	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP-reductase	F	GGCGCAAAGTAGTAGTGGC	105	1.918
			R	TACATTAGCTGCGACGGCAA		

\*NA not applicable

### 2.3.8 Membrane fatty acid analysis

Bacterial pellets were washed twice with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) to remove unincorporated #FA. FA extraction and methylation were performed as previously described (Dubois-Brissonnet et al., 2016; Touche et al., 2023). Briefly, FA were saponified and methylated with methanolic NaOH and methanolic HCl solutions (1st step: 1 mL 3.75 M NaOH in 50% v/v methanol solution for 30 min at 100°C; 2nd step: addition of 2 mL 3.25 M HCl in 45% v/v methanol solution for 10 min at 80°C). FA methyl esters (FAME) were extracted with a diethyl ether/cyclohexane solution (1:1 v/v), and the organic phase was finally washed with a dilute NaOH solution

(0.3 M NaOH). Reagents were purchased from Sigma Aldrich, Merck KGaA. Analytical gas chromatography of FAME was carried out on a GC-MS Trace 1300/ISQ 7000 (Thermo Fisher Scientific) equipped with a BPX70 capillary column (25 m, 0.22 mm id) (SGE™, Victoria, Australia). The column temperature was set at 100°C for 1 min and then increased to 170°C at the rate of 2°C/min. FAME were expressed as a percentage of the total area and grouped into classes: saturated fatty acids (SFA), unsaturated fatty acids (UFA), *iso*- and *anteiso*-branched-chain fatty acids (*i*-BFA and *a*-BFA).

### 2.3.9 Transmission electron microscopy

Bacterial pellets were fixed for 1 hour at room temperature with 2% glutaraldehyde (Delta Microscopies, Mauressac, France) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 5°C. Cells were resuspended in 0.1 M cacodylate buffer (Delta Microscopies) and stored at 4°C (maximum 3 weeks). Cells were loaded onto a carbon film membrane on a 300-mesh copper grid which was rinsed twice with 0.1 M cacodylate buffer and stained with 1% uranyl acetate (Delta Microscopies). Finally, the grid was observed with a Hitachi HT7700 80kV transmission electron microscope (TEM) at the MIMA2 platform (Paris-Saclay University, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France, <https://www6.jouy.inrae.fr/mima2/>). Images were acquired with a charge-coupled device (CDD) camera (AMT Imaging, Woburn, USA). Cell and flagella lengths were measured on all the original micrographs using NIH ImageJ software (V1.54d). In each image, the total flagellar length was measured using the free-hand line tool and reported to the number of bacteria in the image to obtain an average flagellar length per bacterium.

### 2.3.10 Statistics

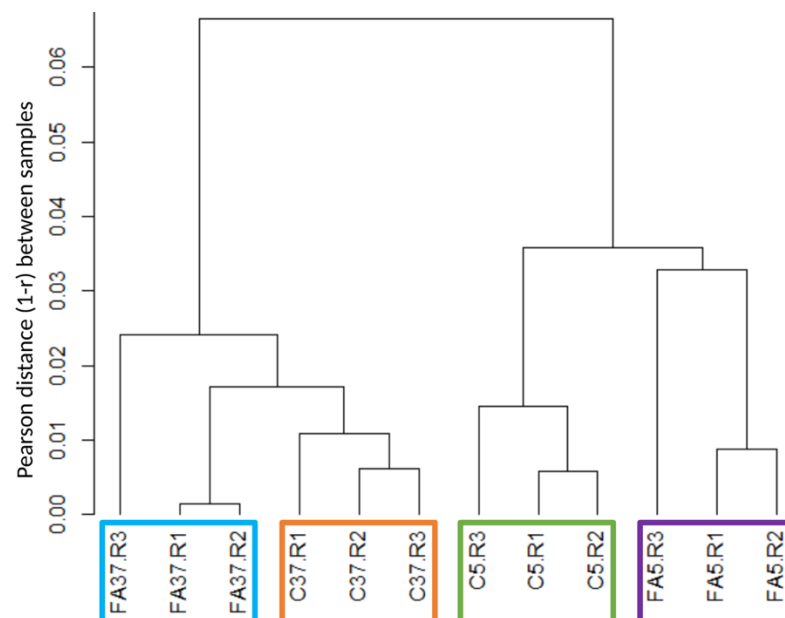
Statistical analysis was performed using GraphPad Software (v.10.1.2, Prism, USA). All experiments were performed with independent subcultures and the number of replicates is specified in the legend of each figure. Two-ways ANOVA with Tukey's multiple comparison test (95% confidence interval) was performed in Figure 2-5 and Figure 2-6. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (95% confidence

interval) was performed in Figure 2-7.B. According to the p-value, results were reported as significantly different \* if  $p < 0.0332$ ; \*\* if  $p < 0.0021$ ; \*\*\* if  $p < 0.0002$ ; \*\*\*\* if  $p < 0.0001$ .

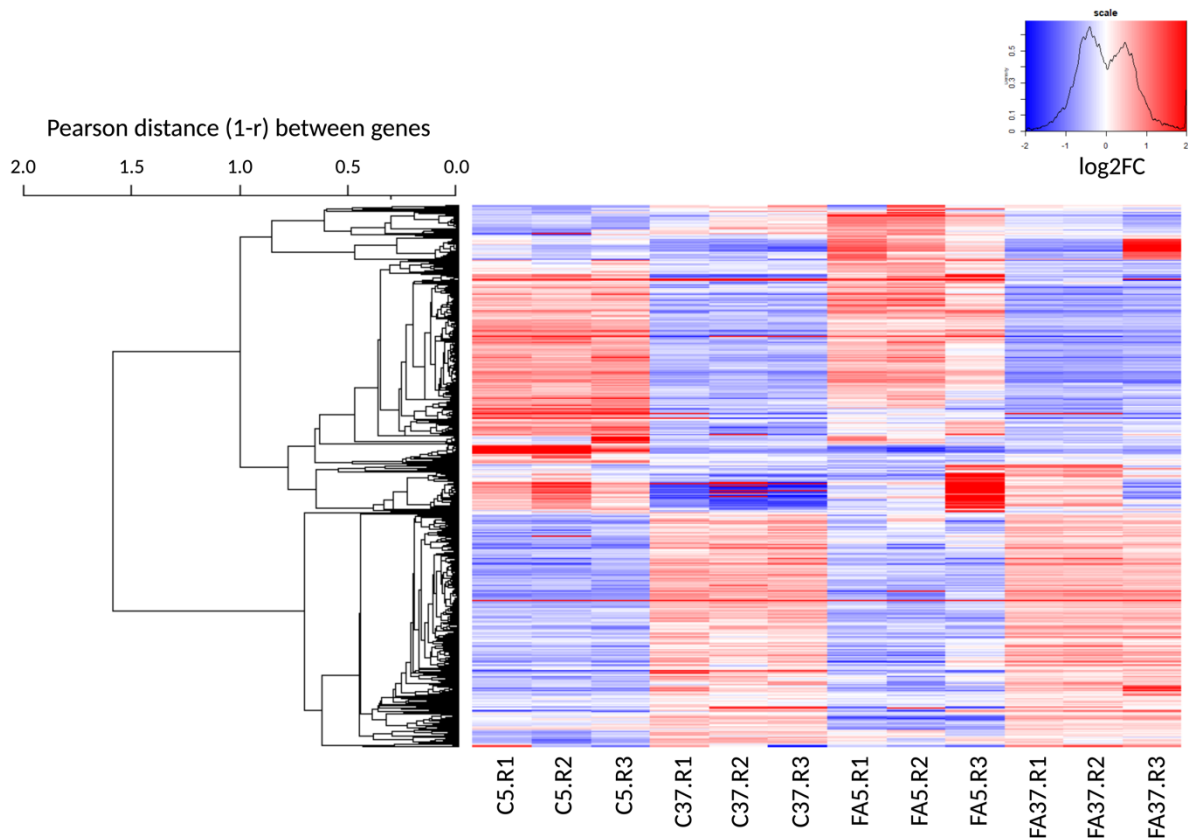
## 2.4 Results

### 2.4.1 Global assessment of the *Listeria monocytogenes* transcriptome

20M to 34M of high-quality paired reads were generated and assigned to the genome of Lm208. Of 2879 genes, 97.1% were expressed (83 genes with fewer than 10 counts in the three biological replicates in all conditions were excluded). Ascending hierarchical clustering of the samples was performed to assess the quality and reproducibility of the RNA-seq data (Figure 2-1, Figure S2-1). The resulting dendrogram reveals that samples are first divided by the impact of temperature, and then by the impact of the presence of #C18:1. According to Pearson distance, replicates with #C18:1 were more heterogenous than control samples at each temperature. The presence of #C18:1 had a greater effect at 5°C than at 37°C.

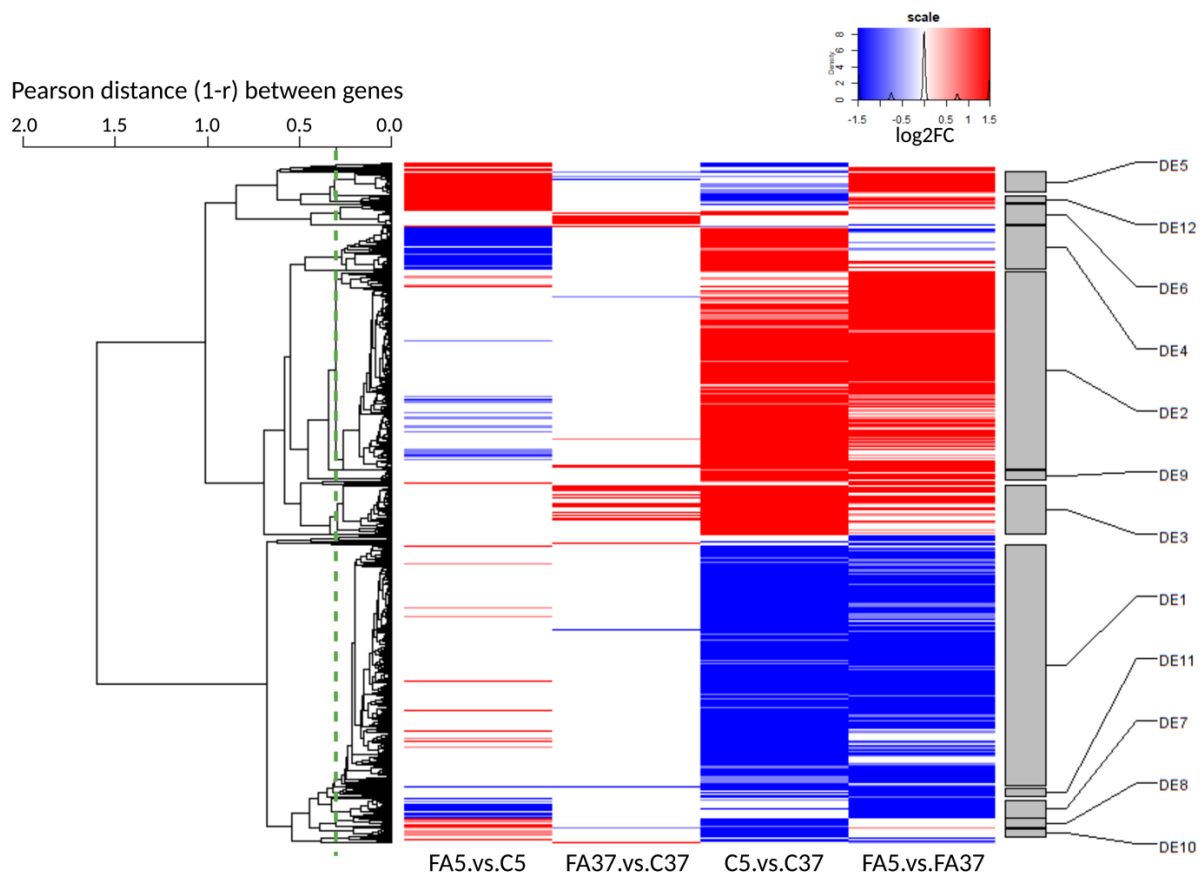


**Figure 2-1.** Hierarchical clustering tree of RNA sequencing biological samples obtained by calculating the Pearson coefficients per pair ( $r$ ) and represented through the Pearson ( $1-r$ ). C indicates control cultures, FA indicates cultures grown with #C18:1, 5 and 37 refer to the culture temperature in °C. R1, R2 and R3 are the three replicates of each condition.



**Figure S2-1.** Evaluation of RNA sequencing data of *Listeria monocytogenes* Lm208 strain at 5°C and 37°C with or without #C18:1w9 supplementation. Of 2879 genes, the numbers of differentially expressed genes in each pairwise comparison of different conditions are reported in red (up-regulated) and blue (down-regulated) ( $q \leq 0.05$  and  $|\log_2FC| \geq 1$ ). The four pairwise comparisons were analyzed with "FA" and "C" corresponding to #C18:1 supplementation and to control conditions without any fatty acid supplementation, respectively, and "5" and "37" referring to the culture temperature.

Of all genes, 1068 were differentially expressed in at least one of the four pairwise comparisons considering a  $q$ -value  $\leq 0.05$  and  $|\log_2FC| \geq 1$  (Figure 2-2). To explore the impact of oleic acid at low temperature, we mainly focused on the pairwise comparison FA5.vs.C5: 94 and 88 genes were up- and down-regulated, respectively. Moreover, the impact of the temperature without #FA was investigated with the pairwise comparison C5.vs.C37: 408 and 414 genes were up- and down-regulated, respectively. The comparison FA37.vs.C37 allowed us to point out the impact of #FA at 37°C: 62 and 6 genes were up- and down-regulated, respectively. Finally, the comparison FA5.vs.FA37 compared the temperature effect in the presence of #C18:1: 337 and 341 genes were up- and down-regulated, respectively.



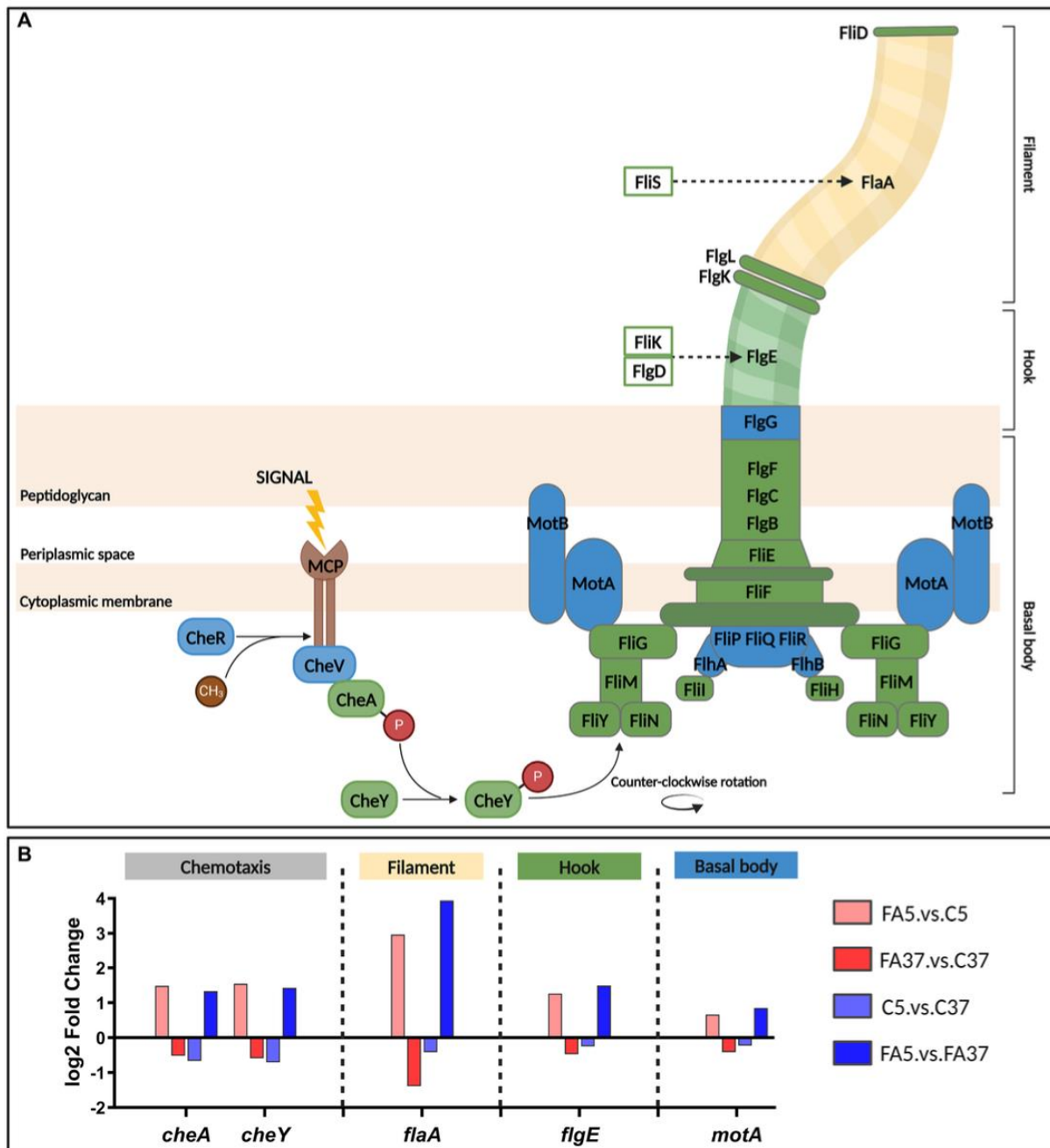
**Figure 2-2.** Global heatmap representation of the relative variations of expression level across 4 pairwise comparisons for differentially expressed genes. C and FA refer to control cultures and cultures grown with #C18:1, 5 and 37 refer to the culture temperature. The dendrogram on the left side of the heatmap represents the hierarchical clustering of the 1068 gene expression profiles across all samples. The dendrogram was cut at an average Pearson correlation of 0.7 (dashed green line) to define the differential expression (DE) clusters on the right side of the heatmap. Clusters were named from DE1 to DE35 by decreasing size. Only clusters with more than 10 genes are represented. Up-regulated genes are reported in red ( $q \leq 0.05$  and  $\log_2FC \geq 1$ ) and down-regulated genes in blue ( $q \leq 0.05$  and  $\log_2FC \leq -1$ ).

The DEG were grouped according to the expression profiles of the four pairwise comparisons into 35 DE clusters. In the 12 DE containing more than 10 genes (Figure 2-2), the three largest clusters, DE1, DE2, and DE3, presented more than half of the 1068 DEG, with 377, 312, and 77 genes, respectively. These genes were mainly involved in general bacterial metabolism. In contrast, in the other DE, the genes were mainly involved in more specific pathways with one or two major functional categories (Table S.2-1). The genes in DE1 were down-regulated at low temperature. They include a cold shock protein (*cspB*), a propionate-CoA-transferase (*Imo2172* called here *pct*) involved in lipid transport and metabolism, and genes involved in virulence (*prfA*, *plcA*,

*hly*, *actA*, and *plcB*). In the presence of #C18:1 at low temperature, *cspB* and *Imo2172* were up-regulated, with a log<sub>2</sub>FC = 1.43 and 2.26, respectively, but genes involved in virulence, as most of the genes from DE1, showed no significant difference in their expression profile. The genes clustered in DE2 and DE3 were up-regulated at low temperature. DE2 included *cspA* and genes encoding for transporters involved in cryoprotection (*opuCABCD*, and *gbuABC* genes). DE3 included genes involved in general function and carbohydrate metabolism (*glpK* and *glpD*). With #C18:1 at low temperature, most of the genes from these three DE showed no significant difference in their expression profiles.

30.4% of DE4 genes are involved in inorganic ion transport and metabolism, such as the genes *tatAC*, *hbp1* and *hbp2*, *isdGEF*, *efeOBU*, and *fhuCBG*. The genes in DE4 were up-regulated at low temperature, mostly with a log<sub>2</sub>FC > 2, but only in the absence of #C18:1 (C5.vs.C37). In the presence of #C18:1 at low temperature (FA5.vs.C5), these genes were also down-regulated, mostly with a log<sub>2</sub>FC < -2.

56.4% of DE5 genes are involved in cell motility, in particular in flagellar assembly. Genes involved in flagellum metabolism are regulated by the TCS CheAY and the response regulator DegU. They are distributed in two large operons (operon 112 in DE5 and operon 111 not classified) with the *flaA* gene encoding the flagellin protein in between (Figure 2-3). The sensory *cheA* and its corresponding response regulatory *cheY* were down-regulated at low temperature (log<sub>2</sub>FC of -0.67 and -0.70, respectively), whereas they were up-regulated with #C18:1 at 5°C with a log<sub>2</sub>FC of 1.48 and 1.54, respectively (Figure 2-3.A). Similarly, the genes of the operon 112 and *flaA* (Figure 2-3.B, represented respectively in green and yellow), which are involved in the assembly of the filament, the hook, and the MS-ring of the basal body, were down-regulated at 5°C and up-regulated when #C18:1 was present (mainly *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI* and *flaA*). The genes of the operon 111 (Figure 2-3.A, represented in blue) involved in the motor switch and the export apparatus were up-regulated only when temperature decreased in the presence of #C18:1 (FA5.vs.FA37).



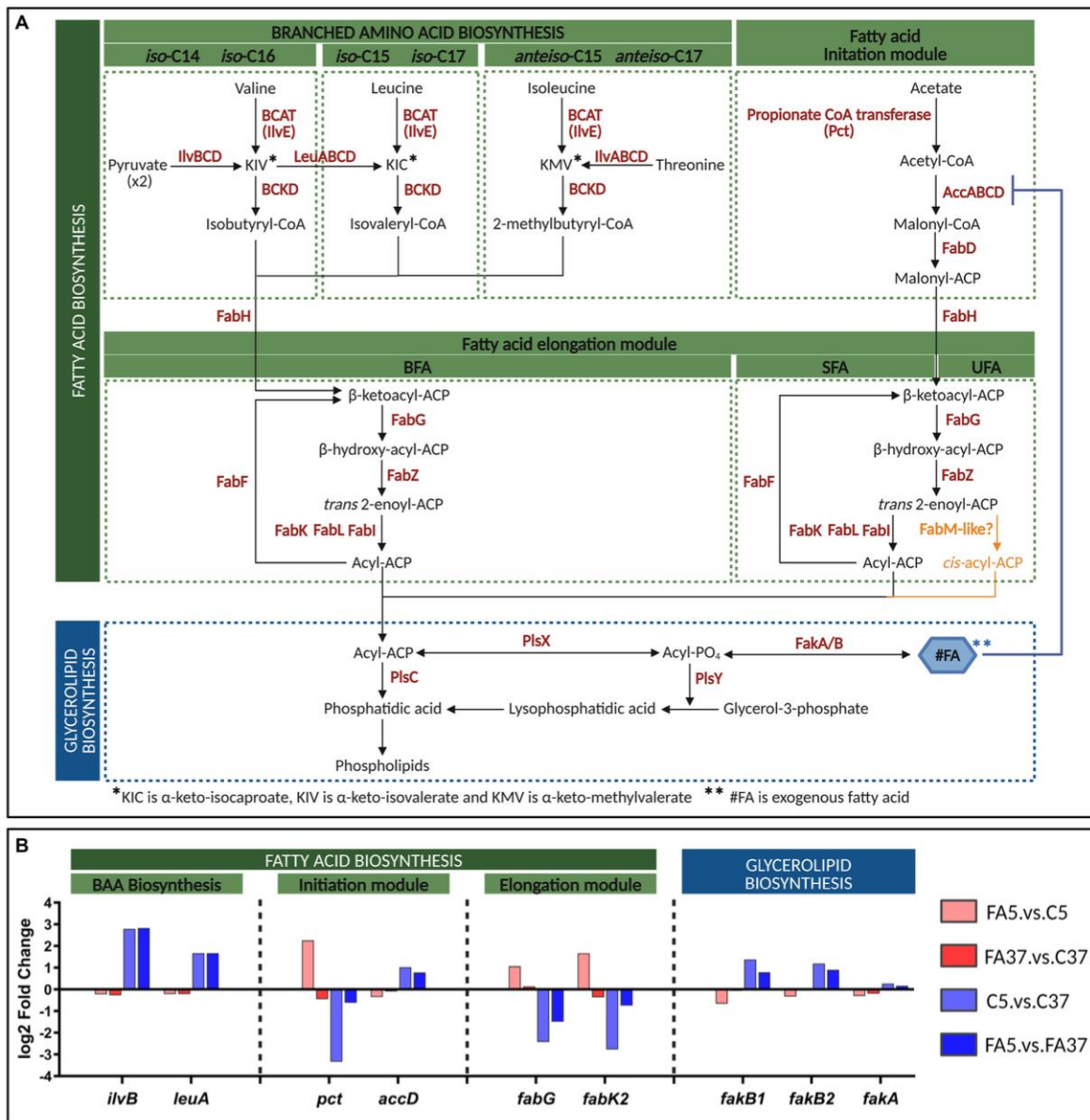
**Figure 2-3.** Chemotaxis and flagellar assembly in *L. monocytogenes* and the transcriptome of key genes at 5°C or 37°C with #C18:1 or without. (A) Chemotaxis signal transduction and organization of flagellar proteins (adapted from Liu and Ochman (2007); Porter et al. (2011); Cheng et al. (2018)). Proteins from operon 111, 112 and FlaA are in blue, green and yellow, respectively. (B) Differential expression (log<sub>2</sub> fold change) of genes of interest. The figure was created with BioRender.com.

46.7% of DE9 genes are involved in amino acid transport and metabolism. DE9 genes were up-regulated (log<sub>2</sub>FC > 1) at 5°C, but the expression of these genes did not change significantly with #C18:1 at this temperature.

## 2.4.2 Deep assessment of the FASII pathway in the global transcriptome

Here, we focused on the genes involved in the well-described lipid metabolism pathways leading to the synthesis of SFA and BFA (Figure 2-4). Genes involved in BFA biosynthesis, forming operon 360 (*ilvABCDN* and *leuABCD*), were clustered in DE2. These genes were up-regulated at 5°C (C5.vs.C37) with a log<sub>2</sub>FC of 2.79 and 1.67 for *ilvB* and *leuA*, respectively (Figure 2-4.B), but the presence of #C18:1 at the same temperature (FA5.vs.C5) did not induce significant differential expression (Figure 2-4.B). No significant difference in gene expression was observed for *ilvE* and genes involved in the branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex formation, whatever the culture conditions. Among genes involved in the FASII initiation module, *pct* (*Imo2172*) was down-regulated at 5°C (log<sub>2</sub>FC = -3.34) but up-regulated with #C18:1 at the same temperature (log<sub>2</sub>FC = 2.26) (Figure 2-4.B). In contrast, *accABCD* genes, involved in the formation of the ACC (acetyl-CoA carboxylase) complex, were up-regulated at low temperature (log<sub>2</sub>FC = 1.02 for *accD*), but not differentially expressed in the presence of #C18:1 at the same temperature (Figure 2-4.B). Among genes involved in the elongation module of FA biosynthesis, two genes showed noticeable opposite differential expressions (Figure 2-4.B). At low temperature, *fabK2* (*Imo2170*) and *fabG* (*Imo2175*) were down-regulated (log<sub>2</sub>FC = -2.77 and -2.43, respectively), while the addition of #C18:1 induced their up-regulation (log<sub>2</sub>FC = 1.66 and 1.06, respectively) (Figure 2-4.B). Genes involved in #FA uptake, in particular the genes *fakB1* and *fakB2* encoding FA-binding proteins, were up-regulated at low temperature (log<sub>2</sub>FC = 1.38 and 1.19, respectively), while their differential expressions in the presence of #C18:1 at the same temperature were down-regulated (*fakB1*) or not significant (*fakB2*) (Figure 2-4.B). No significant differences were observed for the gene *fakA* encoding the FA kinase, whatever the conditions (Figure 2-4.B). Genes involved in glycerolipid biosynthesis, *plsX*, *plsY*, and *plsC*, showed no variation in their expression profile, whatever the conditions (Figure 2-4.B).





**Figure 2-4.** Fatty acid biosynthesis of *L. monocytogenes* and transcriptome of key genes at 5°C or 37°C with or without #C18:1. (A) Pathways of FASII and glycerolipid biosynthesis in *L. monocytogenes* (adapted from Parsons and Rock (2013); Yao and Rock (2017)). A hypothetical pathway for UFA synthesis is depicted in yellow. (B) Differential expression (log<sub>2</sub> fold change) of genes of interest. The figure was created with BioRender.com.

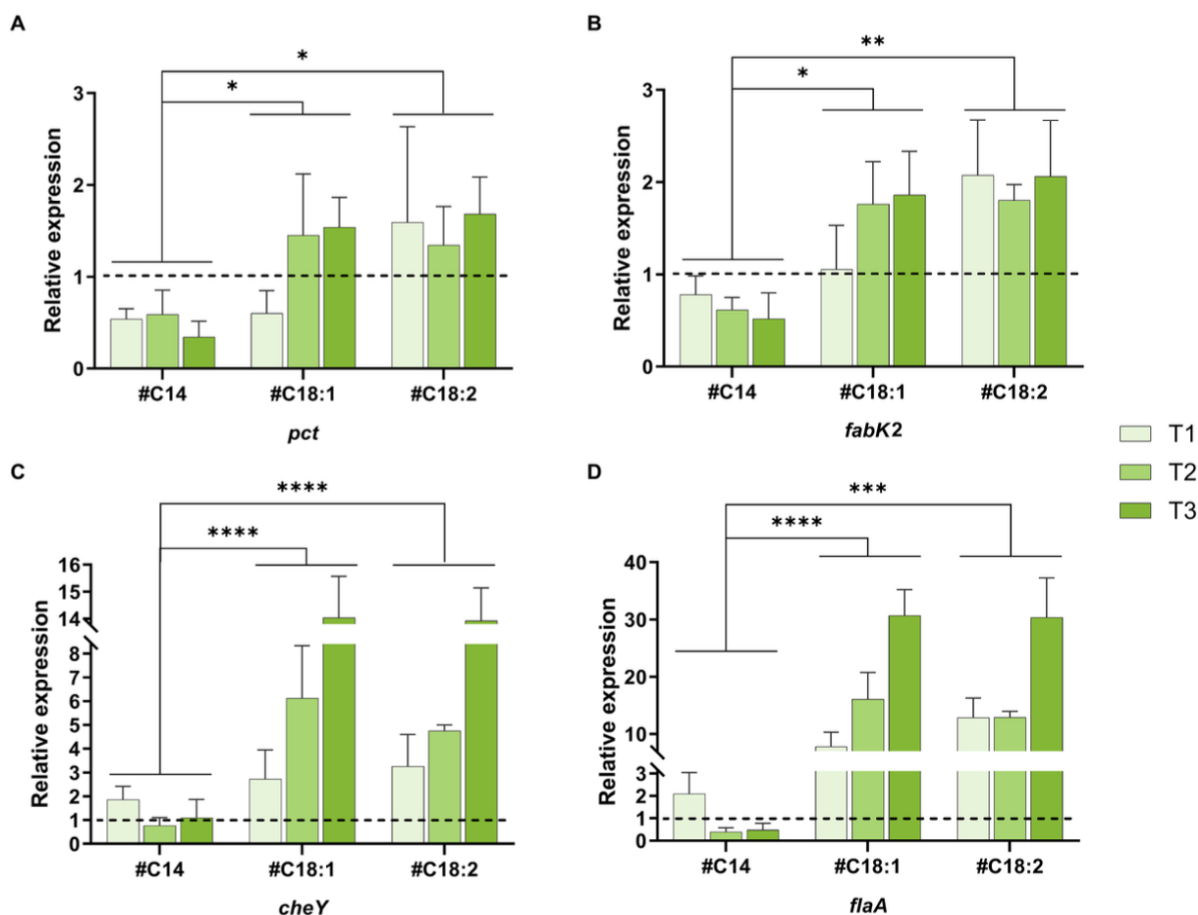
### 2.4.3 Expression profile of five genes of interest by RT-qPCR

To extend the results of the global transcriptome analysis, five genes whose expression was impacted by oleic acid supplementation at low temperature (inverse differential expression between C5.vs.C37 and FA5.vs.C5) were selected for targeted expression analysis using RT-qPCR. These genes are involved in FA biosynthesis (*pct*, *fabG*, and *fabK2*) and chemotaxis and flagellar assembly (*cheY*, *flaA*). Their levels of

relative expression were compared at low temperature in the presence of different #FA (#C14, #C18:1, or #C18:2) and at different time points in the growth phase (T1, T2, T3). First of all, the RT-qPCR results are consistent with the global transcriptome analysis (in presence of #C18:1 at T1).

The relative expressions ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of *pct* in comparison to the control was higher than 1 with #C18:1 and #C18:2 (except T1 in the presence of #C18:1) while it is lower than 1 with #C14 (Figure 2-5.A). No significant difference was observed between cultures with the two #UFA. Furthermore, the difference in relative expression between cultures with #UFA and #C14 was significant (#C18:1: p-value = 0.0339 and #C18:2: p-value = 0.0234). The relative expressions ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of *fabK2* in comparison to the control was higher than 1 with #C18:1 and #C18:2 while it is lower than 1 with #C14 (Figure 2-5.B). No significant difference was observed between the two cultures with #UFA. Furthermore, the difference in relative expression between cultures with #UFA and cultures with #C14 was significant (#C18:1; p-value = 0.0339 and #C18:2; p-value = 0.0043). *fabG* was up-regulated with #C18:1 at T1 compared to the control ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.35$ ), but not in all other conditions (data not shown).

The relative expressions ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) of *cheY* and *flaA* in comparison to the control were higher than 1 when the medium was supplemented with #C18:1 or #C18:2 (Figure 2-5.C and 2-5.D). For each #UFA, the relative expressions of *cheY* and *flaA* significantly increased over time (from T1 to T3) and reached more than 14 and 30, respectively. No significant difference was observed between cultures with the two #UFA. In the presence of #C14, a significant difference in the relative expression level of both genes was only observed with the control at T1. The difference in relative expression between cultures with #UFA and #C14 was overall highly significant (p-value < 0.0001). Unlike *flaA* up-regulated at all time points, the relative expression level of *cheY* depended on the growth phase. Its relative expression at T3 with #C18:1 or #C18:2 was significantly different from the other growth phases (#C18:1: p-value < 0.0001 and 0.004, respectively, and #C18:2: p-value < 0.0001).

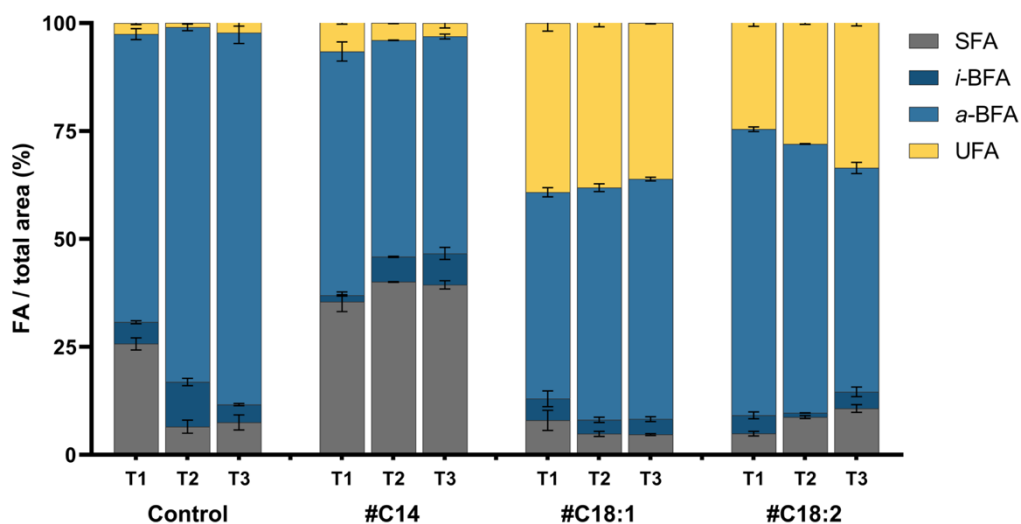


**Figure 2-5.** Quantitative RT qPCR analysis of four genes of interest. Relative expression of *pct* (A), *fabK2* (B), *cheY* (C) and *flaA* (D) of *L. monocytogenes* at 5°C with #C14, #C18:1, #C18:2 at time points T1, T2, T3. The control is fixed to a relative expression level of 1 (dashed black line). Mean and standard deviation are represented (n = 3 to 6)

## 2.4.4 Membrane fatty acid profile

The FA profiles of Lm208 were compared at low temperature in the presence of different #FA (#C14, #C18:1, or #C18:2) and at different time points in the growth phase (T1, T2, T3). The FA composition of Lm208 without #FA was predominantly composed of BFA with 71.7%, 92.5%, and 90.3% of the total FA at T1, T2, and T3, respectively. The most abundant *a*-BFA were *a*-C15:0 (61.5% average over all the growth phases) and *a*-C13:0 (16.2% average over all the growth phases). The proportion of total SFA was significantly lower at T2 (6.5%) and T3 (7.5%) in comparison to T1 (25.7%). The high proportion at T1 was due to a high proportion of C16:0 (11.6% at T1 versus 3.7% and 4.5% at T2 and T3, respectively). Total UFA represented less than 3% of membrane composition whatever the growth phase (Figure 2-6). In the presence of #C14, the level

of SFA in the membrane increased significantly with a level of incorporation of 9.7%, 33.5%, and 31.9% at T1, T2, and T3, respectively, compared to the control. The membrane of #C14 cultures contained 31.9% of C14 versus 4.2% in the control at T1. No significant differences were observed between the different time points of the growth phase (Figure 2-6). In the presence of #C18:1, the proportion of UFA was significantly higher compared to the control (39.2%, 36.8%, and 36.1% at T1, T2, and T3, respectively). The increased proportion was almost exclusively due to the presence of #C18:1 in the membrane. The incorporation of #C18:1 did not significantly change over time. With #C18:2, the results had the same trend as those obtained with #C18:1, but the incorporation of #C18:2 significantly increased with time (21.6%, 24.4, and 30.1% at T1, T2, and T3, respectively) (p-value < 0.0001 between T1 and T3).

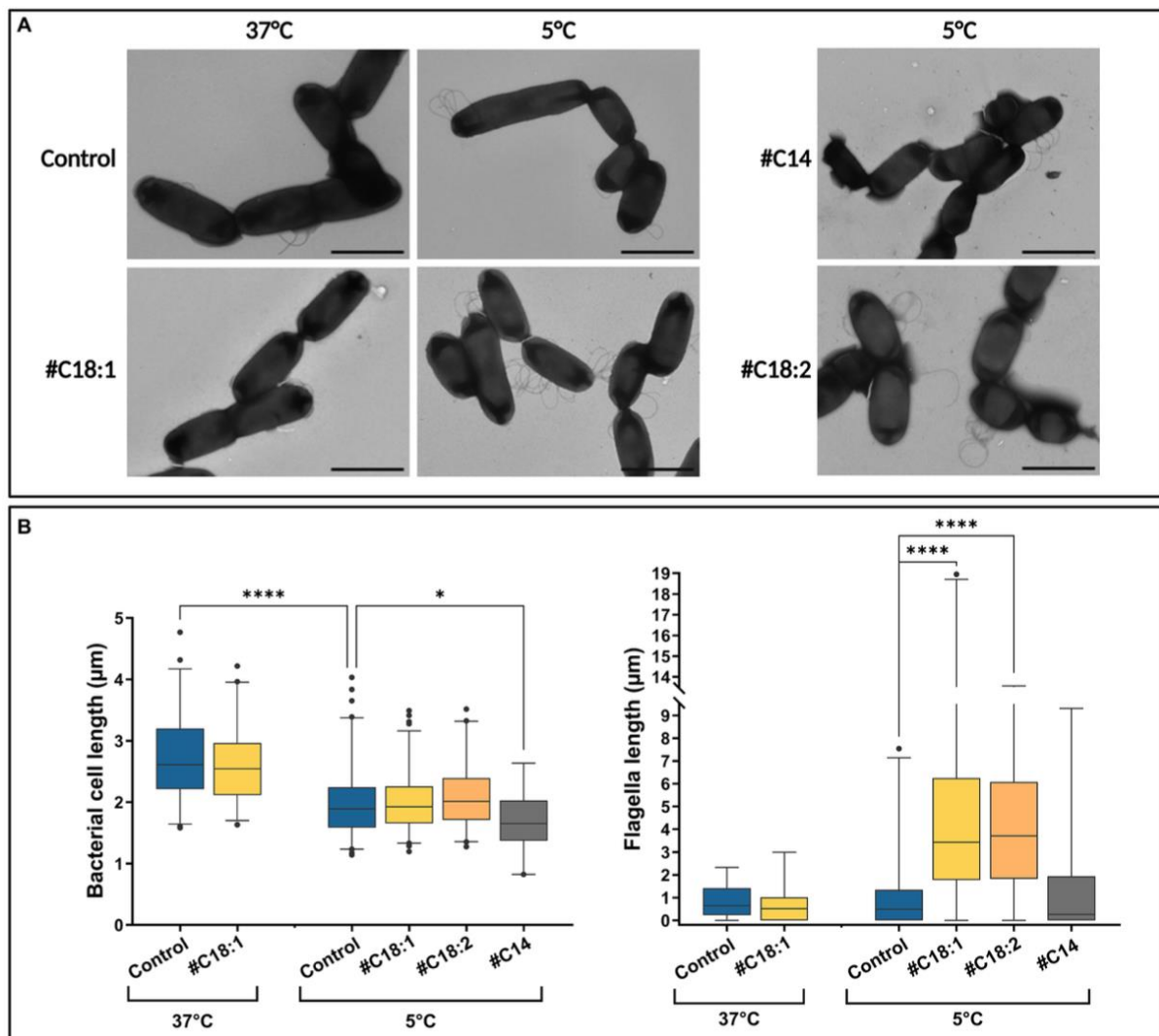


**Figure 2-6.** Fatty acid composition expressed in four FA categories (SFA, i BFA, a BFA and UFA) of *L. monocytogenes* at 5°C with #C14, #C18:1, #C18:2 or without (Control) at time points T1, T2, T3. Mean and standard deviation are represented (n = 3).

### 2.4.5 Cell and flagella morphologies by TEM

Cell and flagella morphologies were compared at 5°C with #C14, #C18:1, or #C18:2 or without #FA at the three time points, and at 37°C with #C18:1 or without #FA at T1. Bacterial cell and flagellar lengths per bacterium were measured in each condition from an overall number of more than 190 images. One representative TEM image of each condition is represented in Figure 2-7.A. For all culture conditions, the

time point in the growth phase did not indicate quantitative differences in bacterial and flagellar lengths per bacterium (data not shown). Without #FA, bacterial cell length significantly decreased at 5°C when compared to 37°C, while flagellar length per bacterium remained similar. With #C18:1, bacterial length was similar to the control at each temperature. Conversely, flagella per cell were significantly longer with #C18:1 at 5°C but not at 37°C. With #C18:2, the results were similar to those with #C18:1 at 5°C. Moreover, many flagella form multiple loops in the images of the cultures grown with each #UFA at low temperature. There was also high variability in terms of flagella length when #UFA were present. With #C14 at 5°C, bacterial length was significantly shorter than the control, but the flagellar length was similar (Figure 2-7.B).



**Figure 2-7.** (A) TEM images and (B) bacterial cell and flagellar lengths of *L. monocytogenes* grown at 5°C or 37°C with #C18:1, #C18:2, #C14 or without (scale bar = 2 μm)

## 2.5 Discussion

In our previous paper (Touche et al., 2023), we demonstrated that exogenous UFA (#UFA), but not exogenous SFA (#SFA), are growth promoters of *Listeria monocytogenes* at low temperature. We also showed that # UFA and #SFA are both over-incorporated at 5°C in comparison with 37°C. In the present study, we aimed to understand the impact of #FA on the behavior of *L. monocytogenes* at low temperature using untargeted and targeted transcriptomics together with the characterization of membrane FA profiles, and cell and flagellar morphologies.

Our results confirm that *L. monocytogenes*, like numerous other bacteria, can incorporate #FA into their membrane. Moreover, we showed here that, when *L. monocytogenes* was grown in the presence of #C14, #C18:1, or #C18:2, the three FA were highly incorporated since the first time point (mid-exponential phase). Bacterial FA profiles did not differ significantly at the subsequent time points of the growth phase (T2 and T3) in the presence of #C14 or #C18:1. The genes encoding FakB1 and FakB2, the FA-binding proteins for SFA and mono-UFA, are up-regulated at low temperature, but the presence of #C18:1 did not induce the increase of expression we could expect according to the corresponding incorporation. These results suggest that the up-regulation of *fakB1* and *fakB2* probably occurs at the early stage of the exponential growth phase, which is consistent with the early FA incorporation and with the changes in growth rate starting from the very beginning of growth (Touche et al., 2023). Furthermore, we can notice that the incorporation of #C18:2 at 5°C significantly increases with time as shown in the bacterial FA profiles. A *fakB3-like* gene encoding for a poly-UFA binding protein probably exists due to the ability of the strain to incorporate #C18:2. Nevertheless, the dynamics of its expression are still unknown because we did not identify it in the genome of Lm208 by BLAST and sequence comparison.

We also analyzed the impact of #FA on the regulation of the FA metabolism. The untargeted transcriptomic analysis showed that genes involved in FASII are greatly affected by both temperature and the presence of #C18:1. Genes involved in BFA synthesis (*ilvABCDN*, *leuABCD*) are up-regulated at low temperature (Figure 2-4). The corresponding over-synthesis of BFA at the expense of SFA when temperature decreases is very well described in the literature (Chihib et al., 2003; Touche et al., 2023). Moreover, some genes involved in FA metabolism are down-regulated at low temperature but up-regulated with #C18:1, especially *pct* (*Imo2172*), encoding propionate-CoA-transferase, which is responsible for the first step of the initiation module of straight chain FA, and *fabK2* involved in SFA *de novo* synthesis. The targeted transcriptomic of *pct* and *fabK2* conducted at low temperature with another #UFA (#C18:2) and one SFA (#C14) showed that both #UFA induced their up-regulation but not #SFA. This highlights the specificity of the regulation of these genes according to the nature of exogenous FA. *pct* is involved at the very beginning of the initiation module of FASII, but it is also involved in other pathways of bacterial synthesis, such as pyruvate metabolism. It is thus quite difficult to draw more hypotheses about its involvement in the uptake of #UFA. *fabK* regulates *de novo* synthesis of SFA and BFA in the membrane. Two *fabK* were identified in Lm208. Only *fabK2* (*Imo2170*) expression was modulated according to the type of #FA : the presence of #SFA and #UFA in the medium induces the decrease and increase of *fabK2* expression, respectively. *fabK* (*Imo0814*) expression is only modulated by the temperature. In *Streptococcus pneumoniae*, it was shown that FabK competes with FabM for the same substrate (*trans*-2-decenoyl-ACP) to modulate the ratio of UFA/SFA in the membrane (Parsons and Rock, 2013). *fabK* expression has to be weakened to allow UFA synthesis to proceed (Dong and Cronan, 2022). Here, even if no *fabM* and *fabN* coding sequences or corresponding homologous protein sequences were not found in the *L. monocytogenes* genome, we hypothesize that Lm208 possesses a *fabM/N-like* gene for UFA *de novo* synthesis because its FA membrane profile contains UFA when grown without #UFA (Touche et al., 2023; this study). We also hypothesize that *fabM/N* could

compete with *fabK2* for modulating the ratio SFA/UFA in the membrane, according to the type of #FA available in its environment. Similarly, Zheng et al. (2005) showed that some #FA, but not all, inhibited FabI in *S. aureus* at 37°C. FabI, similarly to FabK, is an enoyl-ACP reductase that catalyzes the final step of the chain elongation process of the FASII. The modulation between the two pathways for SFA and UFA syntheses does not exist in *S. aureus* which cannot synthesize UFA. #UFA, but not #SFA, inhibited FabI, increased the fluidity of the *S. aureus* membrane, and showed antibacterial activity at 37°C (Zheng et al., 2005). The temperature probably plays here a very important role in the regulation of FASII pathways in the presence of #FA because of its direct impact on membrane fluidity.

In addition, in several bacterial strains, UFA are produced by a post-synthesis mechanism using a desaturase system. In *B. cereus*, two desaturases have been identified, DesA and DesB, which catalyze the formation of double bonds in the acyl chain of FA (Diomandé et al., 2015). To achieve double bond formation, desaturases recruit and activate molecular oxygen with the use of an active-site di-iron cluster (Diaz et al., 2002). No desaturase was found in the genome of Lm208, but our results show that genes involved in iron uptake, such as *fhuCBG* and *tatAC*, are up-regulated when temperature decreases and down-regulated with #C18:1 at low temperature. This is compatible with the hypothesis, already suggested by Hingston et al. (2017) and Touche et al. (2023), that *L. monocytogenes* could possess an iron-dependent desaturase-like system which is activated by low temperature, but not when UFA are incorporated in the membrane.

Interestingly, we shed light on an unexpected connection between the presence of #UFA at low temperature and the expression of chemotaxis and flagellar assembly genes. At low temperature without #FA, most chemotaxis and flagellar assembly genes are not differentially expressed (*flaA*, operon 111 and 114) or down-regulated (operon 112), as already observed by Hingston et al. (2017). The impact of the temperature on *L. monocytogenes* is well known, this bacterium being motile below 25°C but not at



37°C (Liu et al., 2002; Anses, 2020). The presence of #C18:1 at low temperature leads to the up-regulation of all genes in operon 112, *motA*, *gamR*, *cheV* in operon 111, and *flaA*, in association with the appearance of a remarkable bacterial phenotype trait, being numerous and long-looped flagella. More specifically, the targeted transcriptomic analysis revealed that *cheY* and *flaA* were also up-regulated in the presence of another #UFA (#C18:2), but not in the presence of #SFA (#C14). TEM observations confirm the increase in flagellar length per bacterium in the presence of #UFA, but not with #SFA. In addition, this phenotype appeared with #C18:1 only at 5°C but not at 37°C. We thus hypothesize a role of #UFA in the regulation of genes involved in motility and flagella biosynthesis at low temperature. In *L. monocytogenes*,  $\Delta$ *cheAY* and  $\Delta$ *degU* mutants are respectively non-motile and non-flagellated (Dons et al., 2004; Williams et al., 2005). As in most firmicutes, DegU is the temperature-response regulator of motility and chemotaxis in *L. monocytogenes*. When active, at lower temperature than 25°C, DegU directly represses its own expression by binding its promoter and activates chemotaxis and flagellar motility gene expression by binding the upstream region of operon 111 and the *flaA* gene (Knudsen et al., 2004; Williams et al., 2005; Gueriri et al., 2008). Gueriri et al. (2008) have shown that *degU* also controls the expression of two uncharacterized operons (operons 114 and 295) each of them encoding one methyl-accepting chemotaxis protein (MCP). In our results, these two operons, like operon 112 and *flaA*, are up-regulated in the presence of #C18:1 at low temperature. MCP are transmembrane proteins able to sense chemical and physical signals and are the starting point of the phosphorylation cascade activating the response regulator of a two-component system (TCS). The MCP of operon 114 (*Imo0723*) has been reported as part of CheAY TCS in which it transduces the external signal from extracellular to cytoplasmic histidine kinase (Lacal et al., 2010; Casey et al., 2014). Nevertheless, the cognate DegS kinase of DegU is noticeably absent in the genome of *L. monocytogenes* (Gueriri et al., 2008). The signal sensing system and the nature of the signal remain unknown. We hypothesize here that MCP in operon 295 (*Imo1699*) could be involved in DegU phosphorylation and that the presence of #UFA

could be a chemical signal that activates the system. The chemotaxis signal detected by MCP could be due either to the physical state of the membrane or the specific chemical signal of #UFA.

## 2.6 Conclusions and perspectives

In the present study, we first demonstrated that oleic acid supplementation at low temperature significantly impacts the gene expression of *L. monocytogenes*. Analysis of the expression of genes involved in FA biosynthesis suggests the presence of two potential UFA biosynthesis pathways in *L. monocytogenes*. To identify the genes that could support our hypotheses, such as a *fabM*-like, *des*-like or *fakB3*-like, a bank of deletion mutants will be constructed and submitted to different FA types at low temperature. In addition, we demonstrate that *L. monocytogenes* grown in the presence of UFA but not SFA at low temperature overproduces flagella. These results raise new questions to be addressed, such as the ability of these bacteria to adhere to inert surfaces and produce biofilms in food processing environments. Moreover, as we noted heterogeneity in terms of flagellar length when #UFA are present in the environment, it could be interesting to monitor the expression level of genes of interest at the single-cell level with fluorescent reporters to evaluate the heterogeneity of gene expression in the whole population. Addressing these new questions will help improve understanding of the behavior of *L. monocytogenes* at low temperature and thus help find ways to control this pathogen in foods and food environments.

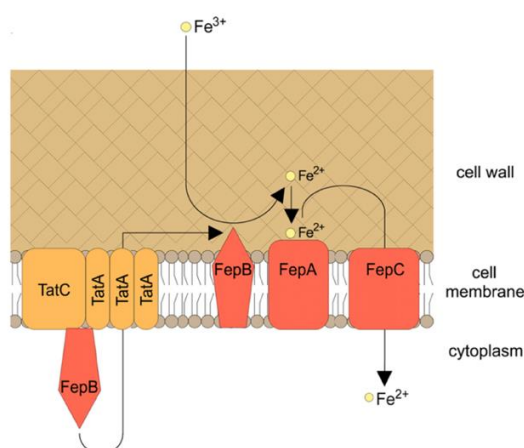
## 2.7 References

*Toutes les références sont reportées à la fin du manuscrit de thèse, partie « Références ».*

## II.3. Résultats complémentaires

Au cours de l'analyse du transcriptome, nous avons observé que certains gènes impliqués dans le métabolisme du fer, dans la réponse au stress froid, ou encore dans la formation de biofilm, la mobilité et le chimiotactisme présentaient un profil d'expression différentielle affecté par la présence d'acides gras exogènes à basse température. Ainsi, nous avons entrepris de suivre le profil d'expression de quatre gènes supplémentaires, *tatA*, *cspB*, *degU* et *dppE* par RT-qPCR.

Les gènes *tatA* et *dppE* sont impliqués dans le transport de métabolites extracellulaires. Le gène *tatA*, en opéron avec *tatC*, code le translocon Tat. À proximité se trouve l'opéron *fepCAB*, codant la perméase FepC, la lipoprotéine FepA présentant une forte affinité avec le fer et la réductase FepB. Les deux systèmes, Tat et Fep, ont une action concertée afin d'internaliser le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) après réduction en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Figure 3-1) (Lechowicz and Krawczyk-Balska, 2015). Le gène *dppE* est homologue au gène *oppA* et code potentiellement une protéine périplasmique impliquée dans l'import de dipeptide en association avec un système transporteur de type ABC (ATP binding-cassette). Non décrit chez *L. monocytogenes*, la protéine DppE est potentiellement impliquée dans le chimiotactisme et le recyclage de mucopeptides, chez *B. subtilis* (Hughes et al., 2022).



**Figure 3-1.** Action concertée des systèmes Tat et Fep pour la réduction du fer ferrique en fer ferreux, puis son internalisation dans la cellule bactérienne. Figure adaptée de Lechowicz and Krawczyk-Balska, 2015).

Quant aux gènes *cspB* et *degU*, ce sont des régulateurs de fonctions centrales de la cellule. Le gène *cspB* code l'une des trois protéines de stress froid présentes chez *L. monocytogenes*. Ces protéines peuvent agir comme chaperons en se liant à l'ADN ou à l'ARN afin de limiter la formation de structures secondaires, ou comme régulateurs transcriptionnels/post-transcriptionnels en se liant aux promoteurs ou à des régions 5' non traduites (5' UTR) pour préserver les fonctions cellulaires, telles que la réplication de l'ADN, la transcription et l'initiation de la traduction dans des conditions de stress (Wouters et al., 2000). Chez *L. monocytogenes*, CspB est impliquée dans la virulence en favorisant l'expression du gène *hly* codant la listériolysine O (LLO) (Schärer et al., 2013). Le gène *degU* code un régulateur transcriptionnel central impliqué dans la motilité, la virulence, la formation de biofilm et la réponse au stress (Knudsen et al., 2004; Williams et al., 2005; Gueriri et al., 2008).

L'objectif de cette étude complémentaire est d'approfondir davantage l'impact de différents acides gras exogènes sur les mécanismes moléculaires aboutissant à la surcroissance observée lors de nos travaux préliminaires. Ainsi, le profil d'expression de ces gènes a été suivi à basse température, à différentes phases de la croissance (T1, T2 et T3), en présence d'un acide gras saturé (#C14), d'un acide gras mono-insaturé (#C18:1) ou d'un acide gras poly-insaturé (#C18:2).

### 3.1 Matériels et méthodes

L'analyse de l'expression de ces quatre gènes par RT-qPCR a été menée avec la même méthode que celle mise en œuvre dans l'article n°3 présenté précédemment (Cf. Résultats expérimentaux, Partie 2 – II.2 ; 2.3). Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau précédent (Tableau 1-1).

### 3.2 Résultats

Le niveau d'expression relative en RT-qPCR de *tatA*, *degU*, *cspB* et *ddpE* a été mesuré à basse température en présence de différents acides gras exogènes (#C14, #C18:1, ou #C18:2) et à différents temps de la croissance (T1, T2 et T3).

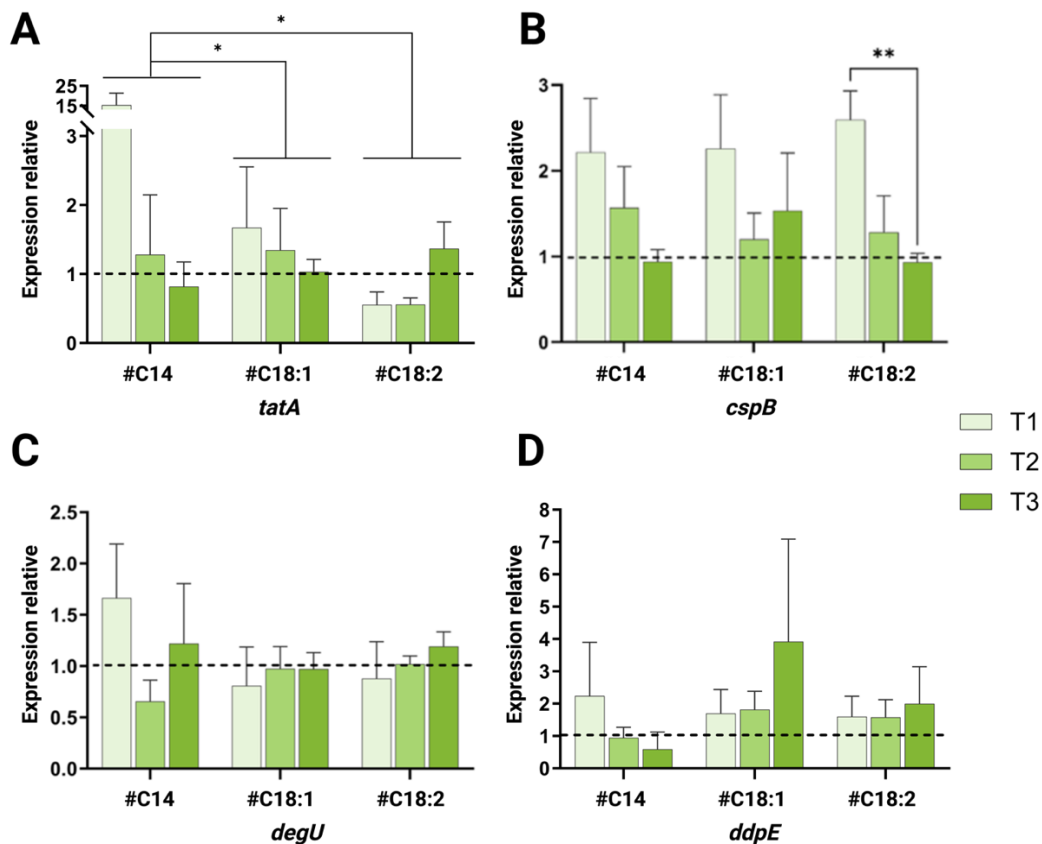
En présence d'acides gras saturés (#C14), le gène *tatA* est significativement sur-exprimé, quelle que soit la phase de croissance, en particulier au T1 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 16,33$ ). En revanche, en présence d'acides gras mono-insaturés (#C18:1), le gène *tatA* n'est significativement sur-exprimé qu'aux temps T2 et T3 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 4,343$  et  $3,499$  au T2 et T3, respectivement). Le même profil d'expression a été observé en présence d'acides gras poly-insaturés (#C18:2) avec une expression relative de, respectivement,  $0,530$ ,  $1,773$  et  $4,955$  aux temps T1, T2 et T3. Aucune différence significative n'a d'ailleurs été observée entre les deux supplémentations en AGI. La différence d'expression relative entre les supplémentations en AGI et en #C14 était significative (#C18:1 : p-value =  $0,0131$  et C18:2 : p-value =  $0,0219$ ) (Figure 3-2.A).

*cspB* est sur-exprimé au T1 en présence d'AGI ou d'AGS par rapport à la condition contrôle. Aucune différence significative n'est observée entre les différents types d'acide gras ou les différentes phases de croissance. Seule une différence significative entre les T1 et T3 en présence de #C18:2 est observée (p-value =  $0,0035$ ) (Figure 3-2.B).

En présence d'acides gras saturés (#C14), *degU* est particulièrement sur-exprimé aux T1 et T3 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,663$  et  $1,219$  au T1 et T3, respectivement), mais sous-exprimé au T2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,655$ ). En revanche, en présence d'acides gras insaturés, l'expression relative du gène n'est pas différente de la condition contrôle (à l'exception au T3 en présence #C18:2 avec un  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,190$ ). Aucune différence significative n'est observée entre les différents types d'acide gras ou les différentes phases de croissance (Figure 3-2.C).

En présence d'acides gras saturés (#C14), *dppE* est sur-exprimé en T1 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2,239$ ), mais sous-exprimé en T2 et T3 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,944$  et  $0,590$  aux T2 et T3, respectivement). En présence d'acides gras insaturés (#C18:1 ou #C18:2), le gène est sur-exprimé à toutes les phases de la croissance, particulièrement en T3 ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 6,917$  et  $2,230$  avec #C18:1 et #C18:2, respectivement). Néanmoins, aucune différence

significative n'est observée entre les différents types d'acide gras ou les différentes phases de croissance (Figure 3-2.D).



**Figure 3-2.** Analyse de l'expression des gènes par RT qPCR des gènes (A) *tatA*, (B) *cspB*, (C) *degU* et (D) *ddpE* de *L. monocytogenes* à 5°C avec C14, #C18:1, #C18:2 à trois points de la phase de croissance (T1, T2, T3). L'expression relative du contrôle est fixée à 1 (ligne pointillée noire). Les moyennes et les écarts-type sont représentés (n = 3 à 6).

### 3.3 Discussion

L'analyse du transcriptome a montré que le gène *tatA* est sur-exprimé à basse température dans la condition contrôle. Cette observation est en accord avec l'étude de Hingston et al. (2017). Le système Tat, composé des protéines TatA et TatC, est impliqué dans le transport du fer dans le milieu intracellulaire *via* l'import de protéines sidérophores à travers la membrane (Tiwari et al., 2015). Les protéines transmembranaires TatA et TatC ont un lien direct avec le système de transport de fer FepCAB, homologue au système Efe chez *Bacillus subtilis* (Lechowicz and Krawczyk-Balska, 2015). En effet, les gènes impliqués dans le transport du fer, dont *tatAC* et

*fepCAB*, sont co-régulés par le même régulateur transcriptionnel Fur lui-même régulé par la concentration de fer intracellulaire (Ledala et al., 2007). Lorsque le milieu est supplémenté #C18:1, *tatA* est sous-exprimé à basse température, mais sur-exprimé en présence de #C14. Par conséquent, nous supposons que les acides gras exogènes influencent l'expression du régulon Fur et donc les gènes impliqués dans le métabolisme du fer. De plus, il a été montré chez *B. subtilis* que les enzymes de type désaturases permettant la formation d'acides gras insaturés étaient dépendantes du fer (Diaz et al., 2002). L'expression des gènes *des* codant ces désaturases est régulée par le TCS DesKR dont le stimulus est le changement de fluidité de la membrane : lors d'une rigidification membranaire, un changement de conformation de l'histidine kinase DesK se produit engendrant une cascade de phosphorylations, puis l'activation des gènes *des* (Aguilar et al., 2001). Dans l'article précédent, nous avons suggéré que *L. monocytogenes* possédait un système de désaturation des acides gras dépendant du fer (Touche et al., 2023). Ici, nos résultats complémentaires vont de pair avec cette hypothèse : il semble avoir un lien entre le fer, la désaturation des acides gras et la fluidité membranaire chez *L. monocytogenes*.

À basse température, les gènes impliqués dans la réponse générale au stress sont altérés. Chez *L. monocytogenes*, trois protéines de stress froid ont été identifiées : CspA (aussi nommée CspL), CspB et CspD. À basse température, *cspA* et *cspB* sont respectivement sur- et sous- exprimés, tandis que l'expression de *cspD* ne change pas. Dans une autre souche de *L. monocytogenes* isolée d'une usine de transformation alimentaire (serotype 1/2a, CC7), lors d'une baisse de température de 20°C à 4°C, le gène *cspA* s'est également révélé sur-exprimé, tandis que *cspB* et *cspD* étaient tous deux sous-exprimés (Hingston et al., 2017). À l'inverse, Schmid et al. (2009) ont observé que les trois gènes sont sur-exprimés à 4°C par rapport à 37°C chez de *L. monocytogenes* EGD-e (serotype 1/2a, CC9) avec *cspA* comme gène le plus induit, puis *cspD* et *cspB*. Ces différences d'expression semblent dépendre de la variabilité génétique des souches de *L. monocytogenes*, mais comme nous l'avons observé ici, *cspA* est la protéine la plus induite pour l'adaptation à basse température (Muchaamba

et al., 2021). En revanche, en présence de #C18:1 à basse température, *cspB* est significativement sur-exprimé, alors que l'expression de *cspA* et *cspD* ne change pas significativement. L'analyse ciblée d'expression a révélé que le profil d'expression de *cspB* n'était pas dépendant de la nature de l'acide gras. Chez *L. monocytogenes* LO28 cette protéine ne serait pas inductible par le froid (Wemekamp-Kamphuis et al., 2002). Nous pouvons émettre l'hypothèse que chez Lm208, CspB est également une protéine non inductible à basse température. À l'heure actuelle, peu d'éléments sont connus sur la régulation et le rôle de CspB.

En analyse transcriptomique, *degU* est sur-exprimé à basse température. Chez la plupart des firmicutes, dont *L. monocytogenes*, DegU est un régulateur impliqué dans la motilité et le chimiotactisme, en activant positivement l'expression de l'anti-répresseur GmaR, un antagoniste du répresseur flagellaire MogR à une température relativement basse (25°C). De plus, lorsque la protéine DegU est active, celle-ci réprime directement sa propre expression en se liant à son promoteur et active l'expression des gènes de chimiotaxie et de motilité en liant la région amont de l'opéron 111 et du gène *flaA* (Knudsen et al., 2004; Williams et al., 2005; Gueriri et al., 2008). Lors d'une supplémentation en C18:1, *degU* est sous-exprimé. Bien que les résultats de l'analyse transcriptomique ciblée ne soit pas significatif, il est possible de constater une surexpression du gène en présence d'un AGS. Nous pouvons supposer que la nature de l'acide gras peut jouer un rôle dans la régulation de *degU* et donc sur les gènes impliqués dans la mobilité et la biosynthèse des flagelles. De plus, chez *L. monocytogenes*, DegU est un régulateur dit « orphelin » de par la perte de la kinase DegS (Gueriri et al., 2008). Néanmoins, Oh et al. (2022) ont démontré que DegU était capable d'interagir avec la région promotrice de l'ADN à la fois aussi bien dans un état non phosphorylé que phosphorylé. L'état phosphorylé lui permettant de renforcer son activité. Gueriri et al. (2008) ont démontré que DegU contrôlait également l'expression de deux opérons non caractérisés codant tous deux pour une protéine de type MCP (de l'anglais *methyl-accepting protein*) et une protéine hypothétique (opérons 114 et 295). Les MCP sont des protéines transmembranaires capables de détecter des signaux



chimiques et physiques, et sont le point de départ de la cascade de phosphorylations activant le régulateur de réponse d'un TCS. Dans nos résultats, les gènes des opérons 114 et 295 sont sur-exprimés en présence de C18:1 à basse température. La MCP de l'opéron 114 étant lié au TCS CheAY (Casey et al., 2014), nous émettons l'hypothèse que la MCP de l'opéron 295 pourrait être impliqué dans la phosphorylation de DegU. Enfin, le gène *degU* est situé sur le même opéron que le gène *fakB1* (mécanisme d'incorporation des acides gras exogènes), ce qui montre qu'il existe une relation étroite entre la motilité bactérienne, le chimiotactisme et la présence d'acides gras exogènes à basse température.

Pour finir, le gène *ddpE* codant une di-peptide-binding protéine d'un ABC transporteur est sous-exprimé à basse température. Chez *B. subtilis*, trois systèmes de perméases dédiés aux transports d'oligonucléotides, Dpp et App et Opp, coexistent et internalisent des oligopeptides (Hughes et al., 2022). Au sein de ces opérons, les gènes *oppA* et *dppE* codent des oligopeptides binding protéines périplasmiques dont la spécificité de substrat définit la nature du peptide transporté (Hughes et al., 2022). Chez *L. monocytogenes* Lm208, la lipoprotéine, OppA et deux homologues DppE et CtaP ont été identifiés dans le génome (Bierne and Cossart, 2007; Darsonval et al., 2024). Bierne et Cossart (2007) ont établi que OppA est nécessaire à la survie bactérienne sous divers stress. Néanmoins, comme c'est le cas pour la souche Lm208, Hingston et al. (2017) ont mis en évidence une sous-expression des gènes *oppA*, *dppE* et *ctaP* à toutes les phases de croissance lors d'une diminution de la température de 20°C à 4°C. Ils ont supposé que ces gènes n'étaient pas nécessaires pour une souche tolérante au froid. Notre analyse transcriptomique révèle que ces gènes sur-exprimés à basse température. L'étude ciblée du gène *ddpE* révèle également une sur-expression en présence d'AGI à toutes les phases de croissance. En présence d'AGS, le gène est sur-exprimé en milieu de phase exponentielle, puis sous-exprimé en fin de phase exponentielle et en début de phase stationnaire. Il semblerait avoir un lien entre l'expression du gène *dppE* avec la composition membranaire et sa fluidité. Néanmoins, le transporteur DppE possède également un lien avec le recyclage du peptidoglycane,

le chimiotactisme et la détection de signaux cellulaires (Hughes et al., 2022). Il est possible que l'expression du gène confère seulement un avantage nutritionnel lors d'une situation de stress. Le rôle de DppE à basse température en présence d'acides gras exogènes doit encore être approfondi.

### 3.4 Conclusion

L'objectif de l'analyse non ciblée du transcriptome était de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans l'utilisation des acides gras exogènes à basse température chez *L. monocytogenes*. Nous avons donc étudié les gènes en lien avec le métabolisme des acides gras, ainsi que les gènes impliqués dans le chimiotactisme et l'assemblage du flagelle (cf. article n°3). Cependant, d'autres voies métaboliques présentaient des profils d'expression surprenant à basse température en présence d'acides gras insaturés, qui nous a amené à conduire cette étude complémentaire. L'analyse de ces quatre gènes supplémentaires nous a permis de (1) renforcer l'hypothèse quant à la présence d'un système de désaturation des acides gras dépendant du fer chez *L. monocytogenes* et (2) mettre en évidence une possible relation entre la motilité cellulaire, le chimiotactisme et la fluidité membranaire.

# DISCUSSION GENERALE

---

La listériose, causée par *Listeria monocytogenes*, est une pathologie d'origine alimentaire posant un véritable problème de santé publique avec un taux de mortalité de 18,1% en Europe en 2022 (EFSA & CDC, 2023). Ubiquitaire et psychrotrophe, *L. monocytogenes* est omniprésente dans les environnements agro-alimentaires (matières premières, chaînes de production et de distribution) ainsi que dans les aliments. Récemment, des études ont montré que la bactérie était capable d'incorporer les acides gras exogènes dans sa membrane, en particulier à basse température, et qu'elle se développait plus rapidement lorsque l'acide gras présent était insaturé (Flegler et al., 2022; Touche et al., 2023). Des simulations ont montré que cette capacité pourrait impacter la durée de conservation des denrées alimentaires et augmenter ainsi le risque de listériose, en particulier les produits prêt-à-manger riches en lipides et conservés à basse température (Touche et al., 2023).

Le but de ce travail de thèse était de comprendre le comportement de *L. monocytogenes* à basse température en présence d'acides gras exogènes en identifiant les mécanismes moléculaires responsables de l'utilisation de ces acides gras exogènes et en étudiant la relation entre leur utilisation et la surcroissance de la bactérie. Parmi un éventail de plusieurs souches de *L. monocytogenes*, l'augmentation du taux de croissance à basse température en présence d'AGI était le plus important pour la souche Lm208. Nous avons donc sélectionné cette souche pour l'ensemble de l'étude. L'utilisation de la souche ayant le phénotype le plus extrême a permis d'amplifier les effets métaboliques, rendant les différences plus facilement observables, nous permettant ainsi de répondre au mieux à nos objectifs. Les principaux résultats de ce travail sont résumés et discutés ci-dessous.

### **Relation entre le génotype et le phénotype**

La première étape de ce travail était la caractérisation du génome de la souche d'intérêt Lm208, dans l'objectif d'identifier les gènes dont l'expression varie dans nos conditions. Le séquençage de son génome, son assemblage de haute qualité et son annotation ont permis l'identification des gènes du système FakA-FakB impliqué dans

l'incorporation des acides gras exogènes ainsi que l'identification de l'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. Néanmoins, parmi les 2736 CDS, 80 et 120 étaient respectivement non présents chez *L. monocytogenes* EGD-e (souche de référence) ou codaient des protéines de fonction inconnue (*hypothetical protein*).

La mesure de similarité des génomes (ANI) a montré une forte similarité entre la souche de référence *L. monocytogenes* EGD-e et la souche Lm208 (supérieure à 99%). Deux bactéries sont considérées comme parentées lorsque leur identité nucléotidique moyenne du génome entier est d'au moins 95% (Jain et al., 2018). Or, contrairement à la souche de référence *L. monocytogenes* EGD-e, la souche Lm208 est capable de se développer plus rapidement à basse température en présence d'AGI. Des recherches récentes ont mis en évidence une hétérogénéité significative des génotypes et des phénotypes entre les isolats de la même espèce, donc malgré leur lien de parenté (Moura et al., 2016; Nysten et al., 2024). Une analyse de comparaison de génome (GWAS) de 51 souches de *L. monocytogenes* d'origine différente et ayant des CC différents a permis de diviser les souches en deux groupes selon leur capacité de croissance à 2°C : rapide ou lente (Fritsch et al., 2019). La croissance lente à 2°C était principalement liée à la lignée I et au CC9 de la lignée II, et 114 gènes accessoires semblaient être impliqués dans cette capacité. (Fritsch et al., 2019). Dans la souchothèque de l'équipe, près d'une cinquantaine de souches de *L. monocytogenes* sont disponibles et séquencées. Il serait pertinent de procéder à l'annotation de chaque génome, puis de réaliser une analyse GWAS. Nous pourrions peut-être ainsi attribuer une fonction aux 80 CDS identifiés dans le génome de Lm208, mais absents de celui d'EGD-e et faire un lien entre l'absence/présence de certains gènes ou SNP et le phénomène de surcroissance en présence d'AGI à basse température.

### **Effet des acides gras dans une matrice alimentaire réelle**

La seconde partie de notre travail était la caractérisation phénotypique de la souche Lm208 en présence d'acides gras exogènes de différentes structures à basse température. Ce travail nous a permis d'établir un lien entre les principaux critères

biochimiques des acides gras et la croissance à basse température. Ces résultats nous ont montré que l'acide gras incorporé n'était pas allongé par le module d'élongation de la FASII, et que les acides gras à 18 carbones étaient ceux favorisant le plus la croissance de la bactérie, contrairement aux AGI à chaîne plus courte ou plus longue. Ce mécanisme semble particulièrement lié à la température de fusion de la membrane, dont l'optimum est entre 18°C et 23°C pour une croissance optimale à basse température. Nos résultats vont donc à l'encontre de l'utilisation des acides gras en tant qu'agent anti-microbien, en particulier à basse température.

Dans cette étude, nous avons uniquement étudié l'effet d'acides gras libres dans un milieu synthétique de laboratoire. Même si le couplage avec la BSA a permis de mimer les interactions de ces acides gras avec les protéines d'un milieu complexe, nous sommes loin d'être en milieu réel. Une étude a mis en évidence que *Vibrio* spp. était capable d'hydrolyser les lipides complexes de l'huile de sardine et d'utiliser les acides gras libérés (Ando et al., 1992). Il a aussi déjà été montré que *L. monocytogenes* était capable d'hydrolyser une molécule complexe (polysorbate) et d'utiliser l'acide gras libéré (Flegler et al., 2022). Étudier le comportement de *L. monocytogenes* dans des milieux de culture plus complexes, par exemple dans des modèles de type émulsion, permettrait d'en savoir davantage sur l'utilisation des acides gras présents dans un aliment. Au sein des matrices alimentaires, les lipides peuvent être présents sous une forme plus complexe (tensioactifs, phospholipides, triglycérides) et peuvent être plus ou moins disponibles pour les microorganismes (Saint-Martin et al., 2022). Dans le but de mimer une matrice alimentaire, plusieurs paramètres pourraient être modifiés : (1) diversifier la composition du milieu par l'ajout de divers nutriments, sucres, glucides ; (2) mimer les micro- et les macro- structures des aliments ; (3) ajouter des communautés microbiennes. Bien que cette approche permette de mimer la structure d'un aliment, la complexité de l'environnement peut compromettre l'effet de l'AGI en tant que promoteur de croissance (interactions avec les composants, disponibilité) (Weiss et al., 2015). Pour étudier le comportement dans une matrice en trois dimensions, nous pourrions utiliser une approche de microscopie confocale laser à

balayage (*CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy*) qui permettrait d'obtenir des informations sur la spatialisation de la bactérie au moment de son développement. (Canette et al., 2019; Saint-Martin et al., 2022)

### **Caractérisation biochimique et structurale des enzymes Fak**

Les protéines FakB, qui se lient aux acides gras exogènes avant de les intégrer dans les FASII, semblent avoir des affinités différentes selon la nature de l'acide gras. Cette sélectivité des FakB a été mise en évidence chez d'autres espèces bactériennes, telles que *S. aureus* ou *S. pneumoniae* (Lambert et al., 2023; Shi et al., 2022; Subramanian et al., 2022).

À ce jour, aucune étude n'a été effectuée quant à la caractérisation morphologique et biochimique des protéines du système FakA-FakB chez *L. monocytogenes*. Chaque protéine du système pourrait être purifiée afin d'étudier leur structure de repliement et leur interaction. Nous pourrions alors étudier la structure de FakA et de ses trois domaines par cristallographie aux rayons X, tout comme l'étude réalisée chez *S. aureus* (Subramanian et al., 2022). Chez *S. aureus*, l'affinité d'interaction entre FakA et FakB2 a été étudiée par *bio-layer interferometry* (BLI), ce qui a permis de modéliser les interactions possibles entre les deux protéines (Myers et al., 2024). Une approche similaire pourrait être envisagée afin de valider les différentes FakB putatives identifiées lors de l'annotation du génome.

### **Approfondissement du rôle de certains gènes pour l'utilisation d'acides gras exogènes par *L. monocytogenes***

Dans la dernière partie de ce travail, l'analyse globale du transcriptome de Lm208 cultivée à 5°C et 37°C avec et sans acide oléique a permis la sélection de plusieurs gènes d'intérêt pour une étude approfondie de l'effet des acides gras (saturé, mono- et poly-insaturé).

L'expression différentielle du gène *fabK*, impliqué dans la synthèse des AGS, nous a permis de faire l'hypothèse de la présence d'une voie de biosynthèse des AGI chez *L. monocytogenes*, voie non décrite formellement chez cette bactérie. Ici, mais également dans de nombreuses autres études, *L. monocytogenes* possède des AGI dans sa membrane même sans supplémentation en acides gras exogènes, aussi bien à 5°C qu'à 37°C, ce qui semble montrer que la bactérie possède une voie de biosynthèse pour ces acides gras. Néanmoins, les gènes codant les enzymes FabM ou FabN, responsables de la biosynthèse des AGI, n'ont pas été identifiés dans le génome, comme indiqué dans le chapitre 2 des résultats. Il est également possible que la biosynthèse des AGI soit effectuée par un système de désaturation, comme chez *B. subtilis* ou *B. cereus*, système non identifié chez *L. monocytogenes* à ce jour. En effet, une étude a montré une réduction de la proportion des AGI membranaires lorsqu'un inhibiteur de désaturase était présent dans des cultures de *L. monocytogenes* (Vadyvaloo et al., 2002). À notre connaissance, aucune étude complémentaire n'aurait été effectuée par la suite. Il serait pourtant pertinent de continuer ce travail en utilisant d'autres inhibiteurs de désaturases tels que le SME (*sterculic acid methyl ester* ou en français l'ester méthylique de l'acide sterculique), afin d'identifier, s'il existe, le système désaturase-*like* chez *L. monocytogenes*.

De plus, nous avons pu observer une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le chimiotactisme et l'assemblage du flagelle (notamment *cheY* et *flaA*) en présence d'AGI à basse température, résultats confirmés par des observations microscopiques. Les flagelles sont reconnus pour être impliqués dans la mobilité cellulaire, l'adhésion aux surfaces et la formation de biofilms (Di Bonaventura et al., 2008; Fan et al., 2020; Wang et al., 2022). Chez *P. aeruginosa*, la présence d'AGI exogènes entraînent une modification de la structure des phospholipides membranaires, ce qui influence ses capacités de formation de biofilm (Baker et al., 2018). Par conséquent, une augmentation de l'abondance des flagelles à basse température en présence d'AGI pourrait favoriser l'adhésion de *L. monocytogenes* sur les surfaces alimentaires dans les usines de transformation des aliments, favoriser sa



persistance dans l'environnement et augmenter le risque de contamination des denrées alimentaires. L'étude de ce phénomène a été initiée dans au sein de l'équipe. Les premiers résultats montrent une modification de la structure du biofilm de Lm208 lors d'une supplémentation en AGI à basse température, avec notamment la formation de clusters volumineux sur les temps courts d'incubation et l'obtention d'une épaisseur plus importante que le témoin en fin de croissance.

### **Évaluation du risque de listériose**

Enfin, la listériose étant une pathologie préoccupante avec un fort taux de mortalité, il serait pertinent de faire une évaluation du risque de listériose sur la population en simulant différents scénarios d'utilisation. Il est possible d'évaluer l'augmentation relative du risque en prenant une situation donnée comme témoin et en établissant divers scénarios. Par exemple, cette approche a été utilisée pour évaluer l'augmentation relative du risque de listériose en cas de retrait du nitrite dans les jambons cuits (Anses, 2022). Avec un retrait complet des nitrites et sans mesure complémentaire, le risque de listériose est 1 200 fois supérieur. En revanche, ce même risque redevient proche de 1, lorsque la dose de nitrite est réduite à 90 mg/L au lieu de 110 mg/L, et que la DLC est parallèlement raccourcie de trois jours (Anses, 2022). Dans le contexte qui nous intéresse, il faudra établir des scénarios de reformulation des aliments avec, par exemple, le remplacement d'un certain pourcentage d'AGS par des AGI, l'utilisation d'une huile végétale plus riche en AGI ou toute autre formulation intéressante dans le cadre de recommandations nutritionnelles. Nous établirons ensuite des propositions permettant de garantir la sécurité des consommateurs malgré ces modifications de formulations (baisse de la température, raccourcissement de la DLC) dont nous estimerons quantitativement l'efficacité.

# REFERENCES

---

- Ababouch, L. H., Bouquartacha, F., and Busta, F. F. (1994). Inhibition of l-alanine triggered *Bacillus cereus* T spore germination and outgrowth by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiology* 11, 385–396. doi: 10.1006/fmic.1994.1044
- Abdelkader, Y., Perez-Davalos, L., LeDuc, R., Zahedi, R. P., and Labouta, H. I. (2023). Omics approaches for the assessment of biological responses to nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 200, 114992. doi: 10.1016/j.addr.2023.114992
- AFNOR (2009). Norme NF V45-008 - Poissons transformés - Méthode pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* aux faibles niveaux de contamination dans le saumon fumé et la truite fumée. *Afnor EDITIONS*. Available at: <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-v45008/poissons-transformes-methode-pour-le-denombrement-de-listeria-monocytogenes/fa159996/32832> (Accessed July 18, 2024).
- AFSSA (2000). Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. Maisons-Alfort: Afssa. Available at: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-Listeria2000.pdf>
- Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C., and de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 20, 1681–1691. doi: 10.1093/emboj/20.7.1681
- Aguilera, J. M. (2019). The food matrix: implications in processing, nutrition and health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59, 3612–3629. doi: 10.1080/10408398.2018.1502743
- Akoh, C. C. ed. (2017). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, Fourth edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Alais, C., Linden, G., and Miclo, L. (2020). *Biochimie alimentaire*, 6e éd. Malakoff (Hauts-de-Seine): Dunod.
- Albanesi, D., and de Mendoza, D. (2016). FapR: From Control of Membrane Lipid Homeostasis to a Biotechnological Tool. *Front Mol Biosci* 3, 64. doi: 10.3389/fmolb.2016.00064
- Alberts, B. ed. (2015). *Molecular biology of the cell*, 6. ed. New York, NY: Garland Science.
- Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., and Prieto, M. (2015). The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *Int J Food Microbiol* 213, 99–109. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004
- Ando, S., Nakajima, K., & Hatano, M. (1992). Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into phospholipids of a marine bacterium *Vibrio* sp. Cultivated with sardine oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(2), 169–171. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90709-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90709-4)

- Ando, S., Yoshida, A., and Hatano, M. (1991). Occurrence of Marine Bacterial Lipase Hydrolyzing Fish Oil. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 2657–2659. doi: 10.1271/bbb1961.55.2657
- Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P., and Wilkinson, B. J. (1997). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 63, 3887–3894. doi: 10.1128/aem.63.10.3887-3894.1997
- Anonyme (2013). Qu'est ce le PMS? *Les services de l'État de la Meuse*. Available at: <https://www.meuse.gouv.fr/Actions-de-l-Etat/Alimentation-consommation-et-commerce/Alimentation-et-Hygiene-alimentaire/Qu-est-ce-le-PMS> (Accessed July 18, 2024).
- Anses (2013). Les guides de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH). *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. Available at: <https://www.anses.fr/fr/content/les-guides-de-bonnes-pratiques-dhygi%C3%A8ne-gbph> (Accessed July 18, 2024).
- Anses (2020). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Listeria monocytogenes*.
- Anses (2023). Résultats de l'étude INCA3. Available at: <https://www.nutractiv.fr/detail-blog/resultats-de-letude-inca-3.htm> | (Accessed June 6, 2024).
- Anses. (2022). *Évaluation des risques liés à la consommation de nitrates et nitrites* (Saisine n°2020-SA-0106; p. 275 p.). Anses.
- Arivaradarajan, P., and Misra, G. eds. (2018). *Omics Approaches, Technologies And Applications: Integrative Approaches For Understanding OMICS Data*. Singapore: Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-2925-8
- Armstrong, R. W., and Fung, P. C. (1993). Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infect Dis* 16, 689–702. doi: 10.1093/clind/16.5.689
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., et al. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44, W16–W21. doi: 10.1093/nar/gkw387
- Aspidou, Z., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., and Koutsoumanis, K. P. (2014). Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Research International* 64, 683–691. doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.031
- Augustin, J.-C., Zuliani, V., Cornu, M., and 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. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x

- Autio, T., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Björkroth, J., Sjöberg, A.-M., and Korkeala, H. (2002). Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *Int J Food Microbiol* 77, 83–90. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00055-7
- Autio, T., Säteri, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Rahkio, M., Lundén, J., and Korkeala, H. (2000). *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. *J Food Prot* 63, 1438–1442. doi: 10.4315/0362-028x-63.10.1438
- Bae, D., Crowley, M. R., and Wang, C. (2011). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* grown on a ready-to-eat meat matrix. *J Food Prot* 74, 1104–1111. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-508
- Bajor, A., Luhr, A., Brockmann, D., Suerbaum, S., Framme, C., and Sedlacek, L. (2016). *Listeria monocytogenes* endophthalmitis – case report and review of risk factors and treatment outcomes. *BMC Infect Dis* 16, 332. doi: 10.1186/s12879-016-1680-2
- Baka, M., Vercruyssen, S., Cornette, N., and Van Impe, J. F. (2017). Dynamics of *Listeria monocytogenes* at suboptimal temperatures in/on fish-protein based model systems: Effect of (micro)structure and microbial distribution. *Food Control* 73, 43–50. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.031
- Baker, L. Y., Hobby, C. R., Siv, A. W., Bible, W. C., Glennon, M. S., Anderson, D. M., et al. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. *BMC Microbiol* 18, 117. doi: 10.1186/s12866-018-1259-8
- Balemans, W., Lounis, N., Gilissen, R., Guillemont, J., Simmen, K., Andries, K., et al. (2010). Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*. *Nature* 463, E3; discussion E4. doi: 10.1038/nature08667
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Bartlett, J. M. S., and Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 226, 3–6. doi: 10.1385/1-59259-384-4:3
- Bayles, D. O., and Wilkinson, B. J. (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 30, 23–27. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00646.x
- Bayles, D. O., Annous, B. A., and Wilkinson, B. J. (1996). Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 62, 1116–1119. doi: 10.1128/aem.62.3.1116-1119.1996
- Bécavin, C., Bouchier, C., Lechat, P., Archambaud, C., Creno, S., Gouin, E., et al. (2014). Comparison of Widely Used *Listeria monocytogenes* Strains EGD, 10403S, and EGD-e Highlights

- Genomic Differences Underlying Variations in Pathogenicity. *mBio* 5, e00969-14. doi: 10.1128/mBio.00969-14
- Bécavin, C., Koutero, M., Tchitchek, N., Cerutti, F., Lechat, P., Maillet, N., et al. (2017). Listeriomics: an Interactive Web Platform for Systems Biology of *Listeria*. *mSystems* 2, e00186-16. doi: 10.1128/mSystems.00186-16
- Becker-André, M., and Hahlbrock, K. (1989). Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res* 17, 9437–9446. doi: 10.1093/nar/17.22.9437
- Begley, M., Gahan, C. G. M., and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 625–651. doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003
- Beld, J., Finzel, K., and Burkart, M. D. (2014). Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases. *Chem Biol* 21, 1293–1299. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.08.015
- Bell, C., and Kyriakides, A. (2012). *Listeria*: A practical approach to the organism and its control in foods. *Springer Science & Business Media*.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., et al. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 526–532. doi: 10.1099/ijs.0.036947-0
- Bharat, A., Petkau, A., Avery, B. P., Chen, J. C., Folster, J. P., Carson, C. A., et al. (2022). Correlation between Phenotypic and In Silico Detection of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* in Canada Using Staramr. *Microorganisms* 10, 292. doi: 10.3390/microorganisms10020292
- Biassoni, R., and Raso, A. eds. (2020). *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4939-9833-3
- Bierne, H., and Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 377–397. doi: 10.1128/MMBR.00039-06
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 20, 798–799. doi: 10.1093/bioinformatics/btg491
- Bitar, A. P., Cao, M., and Marquis, H. (2008). The Metalloprotease of *Listeria monocytogenes* Is Activated by Intramolecular Autocatalysis. *Journal of Bacteriology* 190, 107–111. doi: 10.1128/jb.00852-07
- Black, P. N., DiRusso, C. C., Metzger, A. K., and Heimert, T. L. (1992). Cloning, sequencing, and expression of the fadD gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 25513–25520. doi: 10.1016/S0021-9258(19)74070-8

- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol* 78, 19–30. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00239-8
- Bornert, G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue de Médecine Vétérinaire*. (France), 151.
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., and Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol* 45, 167–178. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.015
- Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., and Poyart, C. (2009). Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature* 458, 83–86. doi: 10.1038/nature07772
- Brocklehurst, T. F., Parker, M. L., Gunning, P. A., Coleman, H. P., and Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II--Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J Appl Bacteriol* 78, 609–615. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03106.x
- Brown, T. A. (2002). "Understanding a Genome Sequence," in *Genomes. 2nd edition*, (Wiley-Liss). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21136/> (Accessed July 5, 2024).
- Buchrieser, C., and Rocourt, J. (2007). "The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification," in *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition*, eds. E. Ryser and E. Marth (CRC Press), 1–20. doi: 10.1201/9781420015188.ch1
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169–193. doi: 10.1677/jme.0.0250169
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Lachaine, R., and Faucher, J. (2012). *Biologie*, 9e éd. Montréal Toronto Paris [etc.]: Pearson.
- Canette, A., Deschamps, J., & Briandet, R. (2019). High Content Screening Confocal Laser Microscopy (HCS-CLM) to Characterize Biofilm 4D Structural Dynamic of Foodborne Pathogens. In A. Bridier (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens: Methods and Protocols* (pp. 171–182). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9000-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9000-9_14)

- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., and García-Fernandez, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *Int J Food Microbiol* 65, 75–82. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00497-9
- Carlin, C. R., Liao, J., Hudson, L. K., Peters, T. L., Denes, T. G., Orsi, R. H., et al. (2022). Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel *Listeria* sensu stricto Species, *L. swaminathanii*. *Microbiol Spectr* 10, e0044222. doi: 10.1128/spectrum.00442-22
- Carlin, C. R., Liao, J., Weller, D., Guo, X., Orsi, R., and Wiedmann, M. (2021). *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71, 004795. doi: 10.1099/ijsem.0.004795
- Casey, A., Fox, E., Schmitz-Esser, S., Coffey, A., McAuliffe, O., and Jordan, K. (2014). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to biocide stress reveals a multi-system response involving cell wall synthesis, sugar uptake, and motility. *Frontiers in Microbiology* 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00068
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., et al. (2016). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 44, D471–480. doi: 10.1093/nar/gkv1164
- CDC (2024). CDC: Listeria Outbreak Linked to Peaches, Nectarines, and Plums. *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/peaches-11-23/details.html> (Accessed July 17, 2024).
- CE (2002). Règlement (CE) n°178/2002 du Parlement européen et du Conseil établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l’Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj>
- CE (2004a). Règlement (CE) n°852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l’hygiène des denrées alimentaires. Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj>
- CE (2004b). Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d’hygiène applicables aux denrées alimentaires d’origine animale. Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>
- CE (2005a). Règlement (CE) n°183/2005 du Parlement européen et du Conseil du 12 janvier 2005 établissant des exigences en matière d’hygiène des aliments pour animaux (Texte présentant de l’intérêt pour l’EEE). Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/183/oj>
- CE (2005b). Règlement (CE) n°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l’intérêt pour l’EEE). Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>



- CE (2007). Règlement (CE) n°1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1441/oj>
- CE (2011). Règlement d'exécution (UE) n°931/2011 de la Commission du 19 septembre 2011 relatif aux exigences de traçabilité définies par le règlement (CE) n°178/2002 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les denrées alimentaires d'origine animale. Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. Available at: [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2011/931/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2011/931/oj)
- CE (2017). Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques. Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013). Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62, 448-452.
- Chan, Y. C., Raengpradub, S., Boor, K. J., and Wiedmann, M. (2007). Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol* 73, 6484-6498. doi: 10.1128/AEM.00897-07
- Charlier, C., Perrodeau, É., Leclercq, A., Cazenave, B., Pilmis, B., Henry, B., et al. (2017). Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 17, 510-519. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7
- Chazarreta-Cifre, L., Martiarena, L., de Mendoza, D., and Altabe, S. G. (2011). Role of ferredoxin and flavodoxins in *Bacillus subtilis* fatty acid desaturation. *J Bacteriol* 193, 4043-4048. doi: 10.1128/JB.05103-11
- Chen, J.-Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., and Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness* 6, 97-120. doi: 10.1016/j.fshw.2017.06.002
- Cheng, C., Wang, H., Ma, T., Han, X., Yang, Y., Sun, J., et al. (2018). Flagellar Basal Body Structural Proteins FlhB, FlhM, and FlhY Are Required for Flagellar-Associated Protein Expression in *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol* 9, 208. doi: 10.3389/fmicb.2018.00208
- Chihib, N.-E., Ribeiro da Silva, M., Delattre, G., Laroche, M., and Federighi, M. (2003). Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiol Lett* 218, 155-160. doi: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11512.x

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1, 581–585. doi: 10.1038/nprot.2006.83
- Chow, C. K. (2008). Fatty acids in foods and their health implications., third edition. Boca Raton (Fla.): CRC press.
- Churchward, C. P., Alany, R. G., and Snyder, L. A. S. (2018). Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology* 44, 561–570. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467875
- Code de la Santé Publique (n.d.). Décret n°99-363 du 6 mai 1999 fixant la liste des maladies faisant l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire et modifiant le code de la santé publique (troisième partie : Décrets) - Légifrance. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000394632> (Accessed July 21, 2024).
- Cofrac (n.d.). La section Laboratoire du Cofrac | COFRAC. Available at: <https://www.cofrac.fr/a-propos-du-cofrac/organisation/section-laboratoires> (Accessed July 21, 2024).
- Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C., and Wekell, M. M. (1990). *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl Environ Microbiol* 56, 2007–2011.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., et al. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 17, 13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8
- Costerus, J. M., Brouwer, M. C., van der Ende, A., and van de Beek, D. (2016). Community-acquired bacterial meningitis in adults with cancer or a history of cancer. *Neurology* 86, 860–866. doi: 10.1212/WNL.0000000000002315
- Cotoni, L. (1942). A propos des bactéries dénommées *Listerella* rappel d'une observation ancienne de méningite chez l'homme. *Annales de l'Institut Pasteur*, 92–95.
- Cotter, P. D., Draper, L. A., Lawton, E. M., Daly, K. M., Groeger, D. S., Casey, P. G., et al. (2008). Listeriolysin S, a Novel Peptide Haemolysin Associated with a Subset of Lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLOS Pathogens* 4, e1000144. doi: 10.1371/journal.ppat.1000144
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., et al. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res* 46, W246–W251. doi: 10.1093/nar/gky425

- Cronan, J. E., and Gelmann, E. P. (1975). Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriol Rev* 39, 232–256. doi: 10.1128/br.39.3.232-256.1975
- Cronan, J. E., and Rock, C. O. (2008). Biosynthesis of Membrane Lipids. *EcoSal Plus* 3. doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.4
- Cuvelier, C., Cabaraux, J., Dufrasne, Hornick, J., and Istasse, L. (2004). Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire* 148, 133–140.
- Cuypers, M. G., Subramanian, C., Gullett, J. M., Frank, M. W., White, S. W., and Rock, C. O. (2019). Acyl-chain selectivity and physiological roles of *Staphylococcus aureus* fatty acid-binding proteins. *J Biol Chem* 294, 38–49. doi: 10.1074/jbc.RA118.006160
- Dai, X., and Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. *Front. Med.* 9. doi: 10.3389/fmed.2022.911861
- Darling, A. E., Mau, B., and Perna, N. T. (2010). progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5, e11147. doi: 10.1371/journal.pone.0011147
- Darsonval, M., Gardon, H., Quilleré, A., Velge, P., Guillier, L., and Dubois-Brissonnet, F. (2024). High-quality genome assembly of *Listeria monocytogenes* Lm208 (CNL 895805): a nondomestic strain able to grow faster in the presence of exogenous unsaturated fatty acids at low temperature. *Microbiology Resource announcements*.
- Davies, D. G., and Marques, C. N. H. (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J Bacteriol* 191, 1393–1403. doi: 10.1128/JB.01214-08
- de Levie, R. (2012). *Advanced Excel for Scientific Data Analysis*, 3rd Edn. Brunswick, Maine: Atlantic Academic.
- de Sarrau, B., Clavel, T., Zwickel, N., Despres, J., Dupont, S., Beney, L., et al. (2013). Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiol* 36, 113–122. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.008
- Deana, A., and Belasco, J. G. (2005). Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev* 19, 2526–2533. doi: 10.1101/gad.1348805
- DeMars, Z., Singh, V. K., and Bose, J. L. (2020). Exogenous Fatty Acids Remodel *Staphylococcus aureus* Lipid Composition through Fatty Acid Kinase. *J Bacteriol* 202, e00128-20. doi: 10.1128/JB.00128-20
- den Bakker, H. C., Bowen, B. M., Rodriguez-Rivera, L. D., and Wiedmann, M. (2012). FSL J1-208, a Virulent Uncommon Phylogenetic Lineage IV *Listeria monocytogenes* Strain with a Small Chromosome Size and a Putative Virulence Plasmid Carrying Internalin-Like Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1876–1889. doi: 10.1128/AEM.06969-11

- den Bakker, H. C., Bundrant, B. N., Fortes, E. D., Orsi, R. H., and Wiedmann, M. (2010). A Population Genetics-Based and Phylogenetic Approach to Understanding the Evolution of Virulence in the Genus *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6085–6100. doi: 10.1128/AEM.00447-10
- den Bakker, H. C., Manuel, C. S., Fortes, E. D., Wiedmann, M., and Nightingale, K. K. (2013). Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3257–3268. doi: 10.1099/ijs.0.048587-0
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., et al. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1882–1889. doi: 10.1099/ijs.0.052720-0
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., and Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods* 52, 149–182. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00155-0
- Derveaux, S., Vandesompele, J., and Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227–230. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.11.001
- Desdouts, M., Reynaud, Y., Philippe, C., and Guyader, F. S. L. (2023). A Comprehensive Review for the Surveillance of Human Pathogenic Microorganisms in Shellfish. *Microorganisms* 11, 2218. doi: 10.3390/microorganisms11092218
- Deshpande, D., Chhugani, K., Chang, Y., Karlsberg, A., Loeffler, C., Zhang, J., et al. (2023). RNA-seq data science: From raw data to effective interpretation. *Front. Genet.* 14. doi: 10.3389/fgene.2023.997383
- Desriac, N., Postollec, F., Coroller, L., Pavan, S., Combrisson, J., Hallier-Soulier, S., et al. (2018). Trustworthy Identification of Resistance Biomarkers of *Bacillus weihenstephanensis*: Workflow of the Quality Assurance Procedure. *Food Anal. Methods* 11, 921–932. doi: 10.1007/s12161-017-1058-0
- DGAL (2021). Surveillance sanitaire des denrées animales et végétales et des aliments pour animaux - Bilan 2020 Plans de surveillance et plans de contrôle.
- DGAL (2022). Surveillance sanitaire des denrées animales et végétales et des aliments pour animaux - Bilan 2021 Plans de surveillance et plans de contrôle.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Chang, J. S., Kim, L. U., Bustin, S. A., Johnson, M. A., et al. (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 344, 141–143. doi: 10.1016/j.ab.2005.05.022
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., et al. (2008).

- Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol* 104, 1552–1561. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x
- Diaz, A. R., Mansilla, M. C., Vila, A. J., and de Mendoza, D. (2002). Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 277, 48099–48106. doi: 10.1074/jbc.M208960200
- Diomandé, S. E., Chamot, S., Antolinos, V., Vasai, F., Guinebretière, M.-H., Bornard, I., et al. (2014). The CasKR two-component system is required for the growth of mesophilic and psychrotolerant *Bacillus cereus* strains at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 80, 2493–2503. doi: 10.1128/AEM.00090-14
- Diomandé, S. E., Doublet, B., Vasai, F., Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., and Brillard, J. (2016). Expression of the genes encoding the CasK/R two-component system and the DesA desaturase during *Bacillus cereus* cold adaptation. *FEMS Microbiol Lett* 363, fnw174. doi: 10.1093/femsle/fnw174
- Diomandé, S. E., Nguyen-the, C., Abee, T., Tempelaars, M. H., Broussolle, V., and Brillard, J. (2015a). Involvement of the CasK/R two-component system in optimal unsaturation of the *Bacillus cereus* fatty acids during low-temperature growth. *Int J Food Microbiol* 213, 110–117. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.043
- Diomandé, S. E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., and Brillard, J. (2015b). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front Microbiol* 6, 813. doi: 10.3389/fmicb.2015.00813
- Disson, O., Moura, A., and Lecuit, M. (2021). Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology* 29, 811–822. doi: 10.1016/j.tim.2021.01.008
- Doijad, S. P., Poharkar, K. V., Kale, S. B., Kerkar, S., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., et al. (2018). *Listeria goensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 3285–3291. doi: 10.1099/ijsem.0.002980
- Dong, H., and Cronan, J. E. (2022). Unsaturated fatty acid synthesis in *Enterococcus faecalis* requires a specific enoyl-ACP reductase. *Mol Microbiol* 118, 541–551. doi: 10.1111/mmi.14981
- Dons, L., Eriksson, E., Jin, Y., Rottenberg, M. E., Kristensson, K., Larsen, C. N., et al. (2004). Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infect Immun* 72, 3237–3244. doi: 10.1128/IAI.72.6.3237-3244.2004
- Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E., and Briandet, R. (2016). The Biofilm Lifestyle Involves an Increase in Bacterial Membrane Saturated Fatty Acids. *Front Microbiol* 7, 1673. doi: 10.3389/fmicb.2016.01673
- Dutoit, A., Decourcelle, N., Mathot, A.-G., and Coroller, L. (2024). Relationships between the inhibitory efficacy and physicochemical properties of six organic acids and monolaurin

- against *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth in liquid medium. *Food Microbiology* 121, 104498. doi: 10.1016/j.fm.2024.104498
- Ebe, Y., Hasegawa, G., Takatsuka, H., Umezue, H., Mitsuyama, M., Arakawa, M., et al. (1999). The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol Int* 49, 519–532. doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00910.x
- ECDC (2024). Listeriosis Annual Epidemiological Report 2022.
- EFSA (2023). Listeria | EFSA. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/listeria> (Accessed July 21, 2024).
- EFSA and CDC (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 21, e8442. doi: 10.2903/j.efsa.2023.8442
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Peterson, M. E., and Pelroy, G. A. (1995). Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants. *J Food Prot* 58, 502–508. doi: 10.4315/0362-028X-58.5.502
- Elfmann, C., Zhu, B., Stülke, J., and Halbedel, S. (2023). ListiWiki: A database for the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Int J Med Microbiol* 313, 151591. doi: 10.1016/j.ijmm.2023.151591
- Eskin, N., and List, G. (2017). "Food applications of lipids," in *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology - 4th edition*.
- Esteban, J. I., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R. A., and Hurtado, A. (2009). Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research* 5, 2. doi: 10.1186/1746-6148-5-2
- EU Commission (2000). Livre blanc sur la sécurité alimentaire | EUR-Lex. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=LEGISSUM%3A132041> (Accessed July 17, 2024).
- Fan, Y., Qiao, J., Lu, Z., Fen, Z., Tao, Y., Lv, F., Zhao, H., Zhang, C., & Bie, X. (2020). Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 137, 109405. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109405>
- Farber, J. M., and Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55, 476–511. doi: 10.1128/mr.55.3.476-511.1991
- Fardet, A. (2015). A shift toward a new holistic paradigm will help to preserve and better process grain products' food structure for improving their health effects. *Food Funct* 6, 363–382. doi: 10.1039/c4fo00477a

- Fardet, A., Souchon, I., and Dupont, D. (2013). *Structure des aliments et effets nutritionnels*. Editions Quae. Available at: <https://hal.science/hal-01195454> (Accessed July 8, 2024).
- Félix, B., Sevellec, Y., Palma, F., Douarre, P. E., Felten, A., Radomski, N., et al. (2022). A European-wide dataset to uncover adaptive traits of *Listeria monocytogenes* to diverse ecological niches. *Sci Data* 9, 190. doi: 10.1038/s41597-022-01278-6
- Fice, D., Shen, Z., and Byers, D. M. (1993). Purification and characterization of fatty acyl-acyl carrier protein synthetase from *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 175, 1865–1870. doi: 10.1128/jb.175.7.1865-1870.1993
- Flegler, A., Iswara, J., Mänz, A. T., Schocke, F. S., Faßbender, W. A., Hölzl, G., et al. (2022). Exogenous fatty acids affect membrane properties and cold adaptation of *Listeria monocytogenes*. *Sci Rep* 12, 1499. doi: 10.1038/s41598-022-05548-6
- Flegler, A., Iswara, J., Mänz, A. T., Schocke, F. S., Faßbender, W. A., Hölzl, G., & Lipski, A. (2022). Exogenous fatty acids affect membrane properties and cold adaptation of *Listeria monocytogenes*. *Scientific Reports*, 12(1), 1499. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05548-6>
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., et al. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* 312, 404–407. doi: 10.1056/NEJM198502143120704
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 41, 430–449. doi: 10.1093/femsre/fux007
- Fraser, J. A., and Sperber, W. H. (1988). Rapid Detection of *Listeria* spp. in Food and Environmental Samples by Esculin Hydrolysis. *Journal of Food Protection* 51, 762–766. doi: 10.4315/0362-028X-51.10.762
- Fritsch, L., Felten, A., Palma, F., Mariet, J.-F., Radomski, N., Mistou, M.-Y., Augustin, J.-C., & Guillier, L. (2019). Insights from genome-wide approaches to identify variants associated to phenotypes at pan-genome scale: Application to *L. monocytogenes*' ability to grow in cold conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.028>
- Fujita, Y., Matsuoka, H., and Hirooka, K. (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol* 66, 829–839. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x
- Gandhi, M., and Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* 113, 1–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008

- García-Gonzalo, D., and Pagán, R. (2015). Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: a review. *Postdoc Journal* 3, 3–13.
- Gaschignard, J., Levy, C., Romain, O., Cohen, R., Bingen, E., Aujard, Y., et al. (2011). Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J* 30, 212–217. doi: 10.1097/inf.0b013e3181fab1e7
- Geer, L. Y., Domrachev, M., Lipman, D. J., and Bryant, S. H. (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res* 12, 1619–1623. doi: 10.1101/gr.278202
- Ghosh, P., Halvorsen, E. M., Ammendolia, D. A., Mor-Vaknin, N., O’Riordan, M. X. D., Brumell, J. H., et al. (2018). Invasion of the Brain by *Listeria monocytogenes* Is Mediated by InlF and Host Cell Vimentin. *mBio* 9, e00160-18. doi: 10.1128/mBio.00160-18
- Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6, 995–1001. doi: 10.1101/gr.6.10.995
- Giotis, E. S., Julotok, M., Wilkinson, B. J., Blair, I. S., and McDowell, D. A. (2008). Role of sigma B factor in the alkaline tolerance response of *Listeria monocytogenes* 10403S and cross-protection against subsequent ethanol and osmotic stress. *J Food Prot* 71, 1481–1485. doi: 10.4315/0362-028x-71.7.1481
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849–852. doi: 10.1126/science.1063447
- Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Ariño, A., and Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods* 4, 271–282. doi: 10.3390/foods4030271
- Grandvalet, C., Assad-García, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., et al. (2008). Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology* 154, 2611–2619. doi: 10.1099/mic.0.2007/016238-0
- Graves, L. M., Hesel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., et al. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1280–1288. doi: 10.1099/ijss.0.014118-0
- Gregory, S. H., Sagnimeni, A. J., and Wing, E. J. (1996). Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J Immunol* 157, 2514–2520.
- Grogan, D. W., and Cronan, J. E. (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 429–441. doi: 10.1128/mmbr.61.4.429-441.1997
- Gueriri, I., Cyncynatus, C., Dubrac, S., Arana, A. T., Dussurget, O., and Msadek, T. (2008). The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and



- is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. *Microbiology (Reading)* 154, 2251–2264. doi: 10.1099/mic.0.2008/017590-0
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., et al. (2010). Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis* 16, 136–138. doi: 10.3201/eid1601.091155
- Gullett, J. M., Cuypers, M. G., Frank, M. W., White, S. W., and Rock, C. O. (2019). A fatty acid-binding protein of *Streptococcus pneumoniae* facilitates the acquisition of host polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 294, 16416–16428. doi: 10.1074/jbc.RA119.010659
- Gullett, J. M., Cuypers, M. G., Grace, C. R., Pant, S., Subramanian, C., Tajkhorshid, E., et al. (2022). Identification of structural transitions in bacterial fatty acid binding proteins that permit ligand entry and exit at membranes. *J Biol Chem* 298, 101676. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101676
- Guo, Y., Ye, F., Sheng, Q., Clark, T., and Samuels, D. C. (2014). Three-stage quality control strategies for DNA re-sequencing data. *Briefings in Bioinformatics* 15, 879–889. doi: 10.1093/bib/bbt069
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086
- Hafner, L., Pichon, M., Burucoa, C., Nusser, S. H. A., Moura, A., Garcia-Garcera, M., et al. (2021). *Listeria monocytogenes* faecal carriage is common and depends on the gut microbiota. *Nat Commun* 12, 6826. doi: 10.1038/s41467-021-27069-y
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 4, 423–434. doi: 10.1038/nrmicro1413
- Haque, A., Engel, J., Teichmann, S. A., and Lönnberg, T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Medicine* 9, 75. doi: 10.1186/s13073-017-0467-4
- Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., et al. (2014). Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* 56, 61–64, 66, 68, passim. doi: 10.2144/000114133
- Heipieper, H. J., Meinhardt, F., and Segura, A. (2003). The cis–trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiology Letters* 229, 1–7. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00792-4
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19. doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r19

- Hellström, S., Laukkanen, R., Siekkinen, K.-M., Ranta, J., Maijala, R., and Korkeala, H. (2010). *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *J Food Prot* 73, 641–648. doi: 10.4315/0362-028x-73.4.641
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat Biotechnol* 11, 1026–1030. doi: 10.1038/nbt0993-1026
- Hingston, P., Chen, J., Allen, K., Truelstrup Hansen, L., and Wang, S. (2017). Strand specific RNA-sequencing and membrane lipid profiling reveals growth phase-dependent cold stress response mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* 12, e0180123. doi: 10.1371/journal.pone.0180123
- Hingston, P., Truelstrup Hansen, L., Pombert, J.-F., and Wang, S. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* enhanced cold-tolerance variants isolated during prolonged cold storage. *International Journal of Food Microbiology* 306, 108262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108262
- Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P., and Fraser, D. W. (1986). An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch Intern Med* 146, 520–524.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., and Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* 82, 801–811. doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012
- Hughes, A. M., Darby, J. F., Dodson, E. J., Wilson, S. J., Turkenburg, J. P., Thomas, G. H., et al. (2022). Peptide transport in *Bacillus subtilis* – structure and specificity in the extracellular solute binding proteins OppA and DppE. *Microbiology* 168, 001274. doi: 10.1099/mic.0.001274
- Hulphers, G. (1911). Liver necrosis in rabbit caused by an hitherto unknown bacterium. *Svenska Vet Tidsskr* 2, 265–273.
- Hwang, B., Lee, J. H., and Bang, D. (2018). Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med* 50, 1–14. doi: 10.1038/s12276-018-0071-8
- IFS Food (n.d.). Food. *IFS Database*. Available at: <https://www.ifs-certification.com/fr/food-standard> (Accessed July 18, 2024).
- Illumina (2023). Illumina Sequencing: Process & Advantages Explained | CosmosID. Available at: <https://www.cosmosid.com/blog/illumina-sequencing-process-and-advantages-explained/> (Accessed July 16, 2024).
- INRAE, and Anses (2013). Etude d'impacts des chartes d'engagements volontaires de progrès nutritionnel sur les volumes de nutriments mis sur le marché: étude actualisée.
- ISO (2017a). ISO 11290-1 -Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la

- recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. *ISO*. Available at: <https://www.iso.org/fr/standard/60313.html> (Accessed July 18, 2024).
- ISO (2017b). ISO 11290-2 : Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. *ISO*. Available at: <https://www.iso.org/fr/standard/60314.html> (Accessed July 18, 2024).
- Jackowski, S., Jackson, P. D., and Rock, C. O. (1994). Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 2921–2928. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42029-1
- Jackson, K. A., Iwamoto, M., and Swerdlow, D. (2010). Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiology & Infection* 138, 1503–1509. doi: 10.1017/S0950268810000294
- Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., et al. (1995). Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl Environ Microbiol* 61, 2242–2246. doi: 10.1128/aem.61.6.2242-2246.1995
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., and Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9, 5114. doi: 10.1038/s41467-018-07641-9
- Janiszewska, D., Szultka-Młyńska, M., Pomastowski, P., and Buszewski, B. (2022). "Omic" Approaches to Bacteria and Antibiotic Resistance Identification. *Int J Mol Sci* 23, 9601. doi: 10.3390/ijms23179601
- Jayarao, B. M., Donaldson, S. C., Straley, B. A., Sawant, A. A., Hegde, N. V., and Brown, J. L. (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in pennsylvania. *J Dairy Sci* 89, 2451–2458. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72318-9
- Jiang, G., Zheng, J.-Y., Ren, S.-N., Yin, W., Xia, X., Li, Y., et al. (2024). A comprehensive workflow for optimizing RNA-seq data analysis. *BMC Genomics* 25, 631. doi: 10.1186/s12864-024-10414-y
- Jiang, Y., Morgan-Kiss, R. M., Campbell, J. W., Chan, C. H., and Cronan, J. E. (2010). Expression of *Vibrio harveyi* Acyl-ACP Synthetase Allows Efficient Entry of Exogenous Fatty Acids into the *Escherichia coli* Fatty Acid and Lipid A Synthetic Pathways. *Biochemistry* 49, 718–726. doi: 10.1021/bi901890a
- Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., et al. (2016). Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food. *EFSA Supporting Publications* 13, 1141E. doi: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-1141

- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002). An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00905-4
- Jones, C. E., Shama, G., Jones, D., Roberts, I. S., and Andrew, P. W. (1997). Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 83, 31–35. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.d01-391.x
- Jongenburger, I., Reij, M. W., Boer, E. P. J., Zwietering, M. H., and Gorris, L. G. M. (2012). Modelling homogeneous and heterogeneous microbial contaminations in a powdered food product. *International Journal of Food Microbiology* 157, 35–44. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.009
- Joshi, M., and Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *Int Jour of Biomed Res* 2, 81–97. doi: 10.7439/ijbr.v2i1.83
- Junker, F., and Ramos, J. L. (1999). Involvement of the cis/trans Isomerase Cti in Solvent Resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 181, 5693–5700.
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., and Truant, J. P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2, 23–28. doi: 10.1128/aac.2.1.23
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* 55, 288–302. doi: 10.1128/mr.55.2.288-302.1991
- Kang, J., Burall, L., Mammel, M. K., and Datta, A. R. (2019). Global transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during growth on cantaloupe slices. *Food Microbiol* 77, 192–201. doi: 10.1016/j.fm.2018.09.012
- Kaplan, H., Ok, F., and Demir, E. (2017). Alpha-linolenic Acid Attenuates Lipopolysaccharide Induced Cystitis. *International Journal of Pharmacology* 13, 649–653. doi: 10.3923/ijp.2017.649.653
- Kelsey, J. A., Bayles, K. W., Shafii, B., and McGuire, M. A. (2006). Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Lipids* 41, 951–961. doi: 10.1007/s11745-006-5048-z
- Keweloh, H., and Heipieper, H. J. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* 31, 129–137. doi: 10.1007/BF02522611
- Kim, B. H., Kim, S., Kim, H. G., Lee, J., Lee, I. S., and Park, Y. K. (2005). The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 151, 209–218. doi: 10.1099/mic.0.27265-0
- Kiran, M. D., Annapoorni, S., Suzuki, I., Murata, N., and Shivaji, S. (2005). Cis-trans isomerase gene in psychrophilic *Pseudomonas syringae* is constitutively expressed during growth and under

- conditions of temperature and solvent stress. *Extremophiles* 9, 117–125. doi: 10.1007/s00792-005-0435-6
- Knudsen, G. M., Olsen, J. E., and Dons, L. (2004). Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence. *FEMS Microbiol Lett* 240, 171–179. doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.039
- Koch, C. M., Chiu, S. F., Akbarpour, M., Bharat, A., Ridge, K. M., Bartom, E. T., et al. (2018). A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59, 145–157. doi: 10.1165/rcmb.2017-0430TR
- Kondakova, T., Kumar, S., and Cronan, J. E. (2019). A novel synthesis of *trans*-unsaturated fatty acids by the Gram-positive commensal bacterium *Enterococcus faecalis* FA2-2. *Chemistry and Physics of Lipids* 222, 23–35. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.04.010
- Koopmans, M. M., Brouwer, M. C., Vázquez-Boland, J. A., and van de Beek, D. (2023). Human Listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 36, e0006019. doi: 10.1128/cmr.00060-19
- Korsak, D., Markiewicz, Z., Gutkind, G. O., and Ayala, J. A. (2010). Identification of the full set of *Listeria monocytogenes* penicillin-binding proteins and characterization of PBPD2 (Lmo2812). *BMC Microbiol* 10, 239. doi: 10.1186/1471-2180-10-239
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., and Sofos, J. N. (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and *aw* when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* 21, 415–422. doi: 10.1016/j.fm.2003.11.003
- Krivoruchko, A., Zhang, Y., Siewers, V., Chen, Y., and Nielsen, J. (2015). Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. *Metab Eng* 28, 28–42. doi: 10.1016/j.ymben.2014.11.009
- Kukurba, K. R., and Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* 2015, 951–969. doi: 10.1101/pdb.top084970
- Lacal, J., García-Fontana, C., Muñoz-Martínez, F., Ramos, J.-L., and Krell, T. (2010). Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environ Microbiol* 12, 2873–2884. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02325.x
- Lambert, C., Poullion, T., Zhang, Q., Schmitt, A., Masse, J.-M., Gloux, K., et al. (2023). A *Streptococcus pyogenes* DegV protein regulates the membrane lipid content and limits the formation of extracellular vesicles. *PLOS ONE* 18, e0284402. doi: 10.1371/journal.pone.0284402
- Lambert, C., Poyart, C., Gruss, A., and Fouet, A. (2022). FabT, a Bacterial Transcriptional Repressor That Limits Futile Fatty Acid Biosynthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 86, e0002922. doi: 10.1128/mmlbr.00029-22
- Lang Halter, E., Neuhaus, K., and Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated

- from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 641–647. doi: 10.1099/ijs.0.036830-0
- Larsen, H., and Seeliger, H. P. R. (1966). A mannitol fermenting *Listeria*. *Listeria grayi* sp. n. *Proceedings of the third international symposium on listeriosis* 1994.
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., and Lee, L.-H. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Front Microbiol* 6, 1227. doi: 10.3389/fmicb.2015.01227
- Leber, A., Zenclussen, M. L., Teles, A., Brachwitz, N., Casalis, P., El-Mouseh, T., et al. (2011). "Pregnancy: Tolerance and Suppression of Immune Responses," in *Suppression and Regulation of Immune Responses: Methods and Protocols*, eds. M. C. Cuturi and I. Anegón (Totowa, NJ: Humana Press), 397–417. doi: 10.1007/978-1-60761-869-0\_25
- Lechowicz, J., and Krawczyk-Balska, A. (2015). An update on the transport and metabolism of iron in *Listeria monocytogenes*: the role of proteins involved in pathogenicity. *Biometals* 28, 587–603. doi: 10.1007/s10534-015-9849-5
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., et al. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2210–2214. doi: 10.1099/ijs.0.017376-0
- Leclercq, A., Moura, A., Charlier-Woerther, C., and Lecuit, M. (2023). Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence *Listeria* – Année 2022. *Institut Pasteur*.
- Leclercq, A., Moura, N., Tessaud-Rita, H., Bracq-Dieye, P., Thouvenot, G., Vales, M. M., et al. (2016). *Listeria thailandensis* sp. nov. isolated from food in Thailand. *Problems of Listeriosis, Isopol XIX*, 14–17.
- Ledala, Nagender., Pearson, S. L., Wilkinson, B. J., and Jayaswal, R. K. (2007). Molecular characterization of the Fur protein of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 153, 1103–1111. doi: 10.1099/mic.0.2006/000620-0
- Lim, S., Chung, D. R., Kim, Y. S., Sohn, K. M., Kang, S. J., Jung, S. I., et al. (2017). Predictive risk factors for *Listeria monocytogenes* meningitis compared to pneumococcal meningitis: a multicenter case–control study. *Infection* 45, 67–74. doi: 10.1007/s15010-016-0939-2
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 55, 645–659. doi: 10.1099/jmm.0.46495-0
- Liu, D. (2024). *Handbook of Molecular Biotechnology*, 1st Edn. Boca Raton: CRC Press. doi: 10.1201/9781003055211
- Liu, D. ed. (2008). *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: Taylor & Francis.

- Liu, R., and Ochman, H. (2007). Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7116–7121. doi: 10.1073/pnas.0700266104
- Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse, P. D., and Wilkinson, B. J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 68, 1697–1705. doi: 10.1128/AEM.68.4.1697-1705.2002
- Liu, Y., Orsi, R. H., Gaballa, A., Wiedmann, M., Boor, K. J., and Guariglia-Oropeza, V. (2019). Systematic review of the *Listeria monocytogenes*  $\sigma$ B regulon supports a role in stress response, virulence and metabolism. *Future Microbiol* 14, 801–828. doi: 10.2217/fmb-2019-0072
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P., and Hartmann, A. (2013). Biotic and Abiotic Soil Properties Influence Survival of *Listeria monocytogenes* in Soil. *PLOS ONE* 8, e75969. doi: 10.1371/journal.pone.0075969
- López-Lara, I. M., and Geiger, O. (2017). Bacterial lipid diversity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862, 1287–1299. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.10.007
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 13, e1005457. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005457
- Luppi, A., Bucci, G., Maini, P., and Rocourt, J. (1988). Ecological survey of *Listeria* in the Ferrara area (northern Italy). *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 269, 266–275. doi: 10.1016/s0176-6724(88)80105-6
- MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M., and Reeves, D. S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int J Food Microbiol* 21, 325–334. doi: 10.1016/0168-1605(94)90062-0
- Madden, R. H., Hutchison, M., Jordan, K., Pennone, V., Gundogdu, O., and Corcionivoschi, N. (2018). Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in premises and products of small food business operators in Northern Ireland. *Food Control* 87, 70–78. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.12.020
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., et al. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res* 52, W521–W525. doi: 10.1093/nar/gkae241

- Mah, T. F., and O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34–39. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2
- Malakar, P. K., Brocklehurst, T. F., Mackie, A. R., Wilson, P. D. G., Zwietering, M. H., and van't Riet, K. (2000). Microgradients in bacterial colonies: use of fluorescence ratio imaging, a non-invasive technique. *International Journal of Food Microbiology* 56, 71–80. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00222-1
- Mansilla, M. C., Aguilar, P. S., Albanesi, D., Cybulski, L. E., Altabe, S., and de Mendoza, D. (2003). Regulation of fatty acid desaturation in *Bacillus subtilis*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68, 187–190. doi: 10.1016/s0952-3278(02)00269-7
- Mao, F., Leung, W.-Y., and Xin, X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol* 7, 76. doi: 10.1186/1472-6750-7-76
- Marrakchi, H., Zhang, Y. M., and Rock, C. O. (2002). Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans* 30, 1050–1055. doi: 10.1042/bst0301050
- MASA (2024a). Guides de Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH). *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire*. Available at: <https://agriculture.gouv.fr/guides-de-bonnes-pratiques-dhygiene-gbph> (Accessed July 18, 2024).
- MASA (2024b). La réglementation sur l'hygiène des aliments. *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire*. Available at: <https://agriculture.gouv.fr/la-reglementation-sur-lhygiene-des-aliments> (Accessed July 17, 2024).
- MASA (n.d.). Plans de surveillance et de contrôle. *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire*. Available at: <https://agriculture.gouv.fr/plans-de-surveillance-et-de-controle> (Accessed July 21, 2024).
- Maury, M. M., Tsai, Y.-H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., et al. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 48, 308–313. doi: 10.1038/ng.3501
- McLauchlin, J., and Low, J. C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet Rec* 135, 615–617.
- MEFSIN (2024). Hygiène alimentaire - Le plan de maîtrise sanitaire : les prérequis et l'HACCP. *economie.gouv.fr*. Available at: <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/hygiene-alimentaire-plan-maitrise-sanitaire-prerequis-et-lhaccp> (Accessed July 18, 2024).
- Meighen, E. A. (1993). Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J* 7, 1016–1022. doi: 10.1096/fasebj.7.11.8370470
- Miettinen, H., Arvola, A., Luoma, T., and Wirtanen, G. (2003). Prevalence of *Listeria monocytogenes*



- in, and microbiological and sensory quality of, rainbow trout, whitefish, and vendace roes from Finnish retail markets. *J Food Prot* 66, 1832–1839. doi: 10.4315/0362-028x-66.10.1832
- Mishra, N. N., Bayer, A. S., Tran, T. T., Shamoo, Y., Mileykovskaya, E., Dowhan, W., et al. (2012). Daptomycin Resistance in Enterococci Is Associated with Distinct Alterations of Cell Membrane Phospholipid Content. *PLOS ONE* 7, e43958. doi: 10.1371/journal.pone.0043958
- Mitra, S. ed. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, NJ: J. Wiley.
- Mohammed, H. O., Stipetic, K., McDonough, P. L., Gonzalez, R. N., Nydam, D. V., and Atwill, E. R. (2009). Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *Am J Vet Res* 70, 383–388. doi: 10.2460/ajvr.70.3.383
- Moinard, S. (2023). Estimateurs de biodiversité robustes pour le métabarcoding. Université Grenoble Alpes [2020-....]. Available at: <https://theses.hal.science/tel-04624750> (Accessed July 1, 2024).
- Montanari, C., Sado Kamdem, S. L., Serrazanetti, D. I., Etoa, F.-X., and Guerzoni, M. E. (2010). Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food Microbiology* 27, 493–502. doi: 10.1016/j.fm.2009.12.003
- Møretrø, T., and Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107–121. doi: 10.1017/S1479050504001322
- Morgan-Kiss, R. M., and Cronan, J. E. (2004). The *Escherichia coli* fadK (ydiD) gene encodes an anaerobically regulated short chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 279, 37324–37333. doi: 10.1074/jbc.M405233200
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954–8, 960, 962.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5, 621–628. doi: 10.1038/nmeth.1226
- Morvan, C., Halpern, D., Kénanian, G., Hays, C., Anba-Mondoloni, J., Brinster, S., et al. (2016). Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials. *Nat Commun* 7, 12944. doi: 10.1038/ncomms12944
- Moura, A., Criscuolo, A., Pouseele, H., Maury, M. M., Leclercq, A., Tarr, C., et al. (2016a). Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* 2, 16185. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.185
- Moura, A., Criscuolo, A., Pouseele, H., Maury, M. M., Leclercq, A., Tarr, C., Björkman, J. T., Dallman, T., Reimer, A., Enouf, V., Larsonneur, E., Carleton, H., Bracq-Dieye, H., Katz, L. S., Jones, L.,

- Touchon, M., Tourdjman, M., Walker, M., Stroika, S., ... Brisse, S. (2016b). Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology*, 2, 16185. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
- Moura, A., Tourdjman, M., Leclercq, A., Hamelin, E., Laurent, E., Fredriksen, N., et al. (2017). Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23, 1462–1470. doi: 10.3201/eid2309.170336
- Moussard, C. (2019). *La biochimie en 250 schémas commentés et en couleurs*. Louvain-la-Neuve (Belgique): De Boeck supérieur.
- Muchaamba, F., Stephan, R., and Tasara, T. (2021a). *Listeria monocytogenes* Cold Shock Proteins: Small Proteins with A Huge Impact. *Microorganisms* 9, 1061. doi: 10.3390/microorganisms9051061
- Muchaamba, F., Wambui, J., Stephan, R., and Tasara, T. (2021b). Cold Shock Proteins Promote Nisin Tolerance in *Listeria monocytogenes* Through Modulation of Cell Envelope Modification Responses. *Front Microbiol* 12, 811939. doi: 10.3389/fmicb.2021.811939
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., and Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29, 407–439. doi: 10.1002/path.1700290409
- Myers, M. J., Xu, Z., Ryan, B. J., DeMars, Z. R., Ridder, M. J., Johnson, D. K., Krute, C. N., Flynn, T. S., Kashipathy, M. M., Battaile, K. P., Schnicker, N., Lovell, S., Freudenthal, B. D., & Bose, J. L. (2024). Molecular basis for the activation of the Fatty Acid Kinase complex of *Staphylococcus aureus*. *bioRxiv*, 2024.03.19.585040. <https://doi.org/10.1101/2024.03.19.585040>
- Mylonakis, E., Hohmann, E. L., and Calderwood, S. B. (1998). Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 77, 313–336. doi: 10.1097/00005792-199809000-00002
- Nadon, C. A., Woodward, D. L., Young, C., Rodgers, F. G., and Wiedmann, M. (2001). Correlations between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2704–2707. doi: 10.1128/jcm.39.7.2704-2707.2001
- Naïtali, M., Guillier, L., and Dubois-Brissonnet, F. (2017). *Risques microbiologiques alimentaires*. Paris: Lavoisier Tec & doc.
- Nestel, P., Clifton, P., and Noakes, M. (1994). Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men. *J Lipid Res* 35, 656–662.

- Neunlist, M. R., Federighi, M., Laroche, M., Sohier, D., Delattre, G., Jacquet, C., et al. (2005). Cellular lipid fatty acid pattern heterogeneity between reference and recent food isolates of *Listeria monocytogenes* as a response to cold stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88, 199–206. doi: 10.1007/s10482-005-5412-7
- Nielsen, P. E. (2002). Sequence-selective DNA recognition by synthetic ligands. *ACS Publications*. doi: 10.1021/bc00007a001
- Nogva, H. K., and Rudi, K. (2004). Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. *Biotechniques* 37, 246–248, 250–253. doi: 10.2144/04372RR01
- Nolan, T., Hands, R. E., and Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1, 1559–1582. doi: 10.1038/nprot.2006.236
- Nowakowski, J., and Tinoco, I. (1997). RNA Structure and Stability. *Seminars in Virology* 8, 153–165. doi: 10.1006/smvy.1997.0118
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., et al. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 844–850. doi: 10.1099/ijsem.0.002596
- Nyfelt, A. (1929). Etiologie de la mononucleose infectieuse. *CR Soc Biol*, 590–591.
- Nysten, J., Sofras, D., & Dijck, P. V. (2024). One species, many faces: The underappreciated importance of strain diversity. *PLOS Pathogens*, 20(1), e1011931. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011931>
- O’Byrne, C. P., and Karatzas, K. A. G. (2008). “The Role of Sigma B ( $\sigma$ B) in the Stress Adaptations of *Listeria monocytogenes*: Overlaps Between Stress Adaptation and Virulence,” in *Advances in Applied Microbiology*, eds. A. I. Laskin, S. Sariaslani, and G. M. Gadd (Academic Press), 115–140. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00605-9
- Oh, H. B., Lee, S.-J., and Yoon, S.-I. (2022). Structural and biochemical analyses of the flagellar expression regulator DegU from *Listeria monocytogenes*. *Sci Rep* 12, 10856. doi: 10.1038/s41598-022-14459-5
- Okike, I. O., Johnson, A. P., Henderson, K. L., Blackburn, R. M., Muller-Pebody, B., Ladhani, S. N., et al. (2014). Incidence, etiology, and outcome of bacterial meningitis in infants aged <90 days in the United kingdom and Republic of Ireland: prospective, enhanced, national population-based surveillance. *Clin Infect Dis* 59, e150-157. doi: 10.1093/cid/ciu514
- Orsi, R. H., and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 5273–5287. doi: 10.1007/s00253-016-7552-2
- Orsi, R. H., Bakker, H. C. den, and Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics,

- evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 79–96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
- Ouchenir, L., Renaud, C., Khan, S., Bitnun, A., Boisvert, A.-A., McDonald, J., et al. (2017). The Epidemiology, Management, and Outcomes of Bacterial Meningitis in Infants. *Pediatrics* 140, e20170476. doi: 10.1542/peds.2017-0476
- Pägelow, D., Chhatbar, C., Beineke, A., Liu, X., Nerlich, A., van Vorst, K., et al. (2018). The olfactory epithelium as a port of entry in neonatal neuroinfection. *Nature Communications* (2018) 9:4269. doi: 10.1038/s41467-018-06668-2
- Painset, A., Björkman, J. T., Kiil, K., Guillier, L., Mariet, J.-F., Félix, B., et al. (2019). LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom* 5, e000257. doi: 10.1099/mgen.0.000257
- Pak, S. I., Spahr, U., Jemmi, T., and Salman, M. D. (2002). Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Prev Vet Med* 53, 55–65. doi: 10.1016/s0167-5877(01)00274-4
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., and Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 52, 413–435. doi: 10.1007/s13353-011-0057-x
- Parker, M. L., Brocklehurst, T. F., Gunning, P. A., Coleman, H. P., and Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I--Methods for investigating the form of growth. *J Appl Bacteriol* 78, 601–608. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03105.x
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., and Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25, 1043–1055. doi: 10.1101/gr.186072.114
- Parsons, J. B., and Rock, C. O. (2011). Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology* 14, 544–549. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.029
- Parsons, J. B., and Rock, C. O. (2013). Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res* 52, 249–276. doi: 10.1016/j.plipres.2013.02.002
- Parsons, J. B., Broussard, T. C., Bose, J. L., Rosch, J. W., Jackson, P., Subramanian, C., et al. (2014). Identification of a two-component fatty acid kinase responsible for host fatty acid incorporation by *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10532–10537. doi: 10.1073/pnas.1408797111
- Pedreira, T., Efmann, C., and Stülke, J. (2022). The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 50, D875–D882. doi: 10.1093/nar/gkab943

- Pernin, A., Guillier, L., and Dubois-Brissonnet, F. (2019). Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiol* 80, 18–24. doi: 10.1016/j.fm.2018.12.010
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pinheiro, J., Lisboa, J., Pombinho, R., Carvalho, F., Carreaux, A., Brito, C., et al. (2018). MouR controls the expression of the *Listeria monocytogenes* Agr system and mediates virulence. *Nucleic Acids Research* 46, 9338–9352. doi: 10.1093/nar/gky624
- Pini, C.-V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J.-L., and Segura, A. (2009). Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microbial Biotechnology* 2, 253–261. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00084.x
- Pirie, J. H. (1927). A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease." *Publ Afr Inst Med Res* 3, 163–187.
- Pirie, J. H. (1940). The Genus *Listerella*. *Science* 91, 383. doi: 10.1126/science.91.2364.383
- Piveteau, P. (2017). "*Listeria monocytogenes*," in *Risques microbiologiques alimentaires*, (Paris: Lavoisier Tec & doc), 481–502.
- Poitras, E., and Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications.
- Porter, S. L., Wadhams, G. H., and Armitage, J. P. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* 9, 153–165. doi: 10.1038/nrmicro2505
- Püttmann, M., Ade, N., and Hof, H. (1993). Dependence of fatty acid composition of *Listeria* spp. on growth temperature. *Res Microbiol* 144, 279–283. doi: 10.1016/0923-2508(93)90012-q
- Qiu, Z., Khairallah, C., and Sheridan, B. S. (2018). *Listeria Monocytogenes*: A Model Pathogen Continues to Refine Our Knowledge of the CD8 T Cell Response. *Pathogens* 7, 55. doi: 10.3390/pathogens7020055
- Quereda, J. J., Dussurget, O., Nahori, M.-A., Ghoulane, A., Volant, S., Dillies, M.-A., et al. (2016). Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 5706–5711. doi: 10.1073/pnas.1523899113
- Quereda, J. J., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Gómez-Martín, Á., García-Muñoz, Á., et al. (2020). *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 5868–5879. doi: 10.1099/ijsem.0.004494

- Quereda, J. J., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., García-Del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., et al. (2021). Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence* 12, 2509–2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526
- Radoshevich, L., and Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 16, 32–46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M.-T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., et al. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56, 743–768. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161038
- Ramsingh, G., Koboldt, D. C., Trissal, M., Chiappinelli, K. B., Wylie, T., Koul, S., et al. (2010). Complete characterization of the microRNAome in a patient with acute myeloid leukemia. *Blood* 116, 5316–5326. doi: 10.1182/blood-2010-05-285395
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., and Cocolin, L. (2008). Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 121, 99–105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006
- Raufu, I. A., Moura, A., Vales, G., Ahmed, O. A., Aremu, A., Thouvenot, P., et al. (2022). *Listeria ilorinensis* sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72, 005437. doi: 10.1099/ijsem.0.005437
- Ray, T. K., and Cronan, J. E. (1976). Activation of long chain fatty acids with acyl carrier protein: demonstration of a new enzyme, acyl-acyl carrier protein synthetase, in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4374–4378. doi: 10.1073/pnas.73.12.4374
- Raynaud, S. (2022). Le « Paquet hygiène » - 2022. *Métiers de l'Alimentation*. Available at: <https://www.metiers-alimentation.ac-versailles.fr/spip.php?article817> (Accessed July 18, 2024).
- Ribet, D., and Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection* 17. doi: 10.1016/j.micinf.2015.01.004
- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., et al. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J* 16, e05134. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5134
- Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Kongo, J. M., and Wiedmann, M. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* 152, 685–693. doi: 10.1099/mic.0.28503-0
- Rocourt, J., and Grimont, P. A. D. (1983). Notes: *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33, 866–869. doi: 10.1099/00207713-33-4-866

- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., and Piffaretti, J. C. (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* 42, 171–174. doi: 10.1099/00207713-42-1-171
- Rogiers, G., Kebede, B. T., Van Loey, A., and Michiels, C. W. (2017). Membrane fatty acid composition as a determinant of *Listeria monocytogenes* sensitivity to trans-cinnamaldehyde. *Res Microbiol* 168, 536–546. doi: 10.1016/j.resmic.2017.03.001
- Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr* 7. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018
- Rolhion, N., Chassaing, B., Nahori, M.-A., de Bodt, J., Moura, A., Lecuit, M., et al. (2019). A *Listeria monocytogenes* Bacteriocin Can Target the Commensal *Prevotella copri* and Modulate Intestinal Infection. *Cell Host Microbe* 26, 691–701.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.10.016
- Rothfield, L. (1971). *Structure and function of biological membrane.*, Academic Press.
- Roussel, S., Leclercq, A., Santolini, J., Agbessi, A., Chenal-Francisque, V., Lailier, R., et al. (2012). Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments.
- Rumbaugh, K. P., and Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* 18, 571–586. doi: 10.1038/s41579-020-0385-0
- Ryser, E. T., and Marth, E. H. eds. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety.*, 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Sabirova, J. S., Hernalsteens, J.-P., De Backer, S., Xavier, B. B., Moons, P., Turlej-Rogacka, A., et al. (2015). Fatty acid kinase A is an important determinant of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* USA300. *BMC Genomics* 16, 861. doi: 10.1186/s12864-015-1956-8
- Sado-Kamdem, S. L., Vannini, L., and Guerzoni, M. E. (2009). Effect of  $\alpha$ -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 129, 288–294. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.010
- Saint Martin, C., Darsonval, M., Grégoire, M., Caccia, N., Midoux, L., Berland, S., et al. (2022). Spatial organisation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 cultivated in gel matrices. *Food Microbiol* 103, 103965. doi: 10.1016/j.fm.2021.103965
- Saint-Martin, C., Jubelin, G., Darsonval, M., Leroy, S., Leneveu-Jenvrin, C., Hmidene, G., et al. (2022). Genetic, physiological, and cellular heterogeneities of bacterial pathogens in food matrices: Consequences for food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 21, 4294–4326. doi: 10.1111/1541-4337.13020
- Saito, H. E., Harp, J. R., and Fozo, E. M. (2018). Enterococcus faecalis Responds to Individual Exogenous Fatty Acids Independently of Their Degree of Saturation or Chain Length. *Appl Environ Microbiol* 84, e01633-17. doi: 10.1128/AEM.01633-17

- Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., de la Fuente, L., and Vázquez, J. A. (2003). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol* 41, 757–762. doi: 10.1128/JCM.41.2.757-762.2003
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Santé Publique France (2024). Les objectifs de la déclaration obligatoire. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-a-declaration-obligatoire/definition-objectifs-criteres-acteurs-de-la-declaration-obligatoire> (Accessed July 21, 2024).
- Sauders, B. D., Sanchez, M. D., Rice, D. H., Corby, J., Stich, S., Fortes, E. D., et al. (2009). Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. *J Food Prot* 72, 2337–2349. doi: 10.4315/0362-028x-72.11.2337
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., et al. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* 20, 608–620. doi: 10.1038/s41579-022-00767-0
- Schardt, J. J. (2018). Characterization of *Listeria sensu stricto* specific genes involved in colonization of the gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*.
- Schärer, K., Stephan, R., and Tasara, T. (2013). Cold Shock Proteins Contribute to the Regulation of Listeriolysin O Production in *Listeria monocytogenes*. <https://home.liebertpub.com/fpd>. doi: 10.1089/fpd.2013.1562
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., et al. (1983). Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 308, 203–206. doi: 10.1056/NEJM198301273080407
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M. J., Stephan, R., and Tasara, T. (2009). Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 75, 1621–1627. doi: 10.1128/AEM.02154-08
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., et al. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)* 2020, baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062
- Schoder, D., Guldimann, C., and Märtlbauer, E. (2022). Asymptomatic Carriage of *Listeria monocytogenes* by Animals and Humans and Its Impact on the Food Chain. *Foods* 11, 3472. doi: 10.3390/foods11213472
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3. doi: 10.1186/1471-2199-7-3



- Schuchat, Robinson Katherine, Wenger Jay D., Harrison Lee H., Farley Monica, Reingold Arthur L., et al. (1997). Bacterial Meningitis in the United States in 1995. *New England Journal of Medicine* 337, 970–976. doi: 10.1056/NEJM199710023371404
- Seel, W., Flegler, A., Zunabovic-Pichler, M., and Lipski, A. (2018). Increased Isoprenoid Quinone Concentration Modulates Membrane Fluidity in *Listeria monocytogenes* at Low Growth Temperatures. *Journal of Bacteriology* 200, 10.1128/jb.00148-18. doi: 10.1128/jb.00148-18
- Seeliger, H. P. (1981). [Nonpathogenic listeriae: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977) (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A Med Mikrobiol Infekt Parasitol* 249, 487–493.
- Seeliger, H. P. R., and Höhne, K. (1979). "Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species," in *Methods in Microbiology*, eds. T. Bergan and J. R. Norris (Academic Press), 31–49. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70372-6
- Seeliger, H. P. R., ROCOURT, J., SCHRETTENBRUNNER, A., GRIMONT, P. A. D., and JONES, D. (1984). Notes: *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34, 336–337. doi: 10.1099/00207713-34-3-336
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Sévellec, Y., Ascencio, E., Douarre, P.-E., Félix, B., Gal, L., Garmyn, D., et al. (2022). *Listeria monocytogenes*: Investigation of Fitness in Soil Does Not Support the Relevance of Ecotypes. *Front Microbiol* 13, 917588. doi: 10.3389/fmicb.2022.917588
- Shi, R., McDonald, L., Cui, Q., Matte, A., Cygler, M., and Ekiel, I. (2011). Structural and mechanistic insight into covalent substrate binding by *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1302–1307. doi: 10.1073/pnas.1012596108
- Shi, Zang, N., Lou, N., Xu, Y., Sun, J., Huang, M., et al. (2022a). Structure and mechanism for streptococcal fatty acid kinase (Fak) system dedicated to host fatty acid scavenging. *Sci Adv* 8, eabq3944. doi: 10.1126/sciadv.abq3944
- Shi, Zang, N., Lou, N., Xu, Y., Sun, J., Huang, M., Zhang, H., Lu, H., Zhou, C., & Feng, Y. (2022b). Structure and mechanism for streptococcal fatty acid kinase (Fak) system dedicated to host fatty acid scavenging. *Science Advances*, 8(35), eabq3944. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq3944>
- Sibanda, T., and Buys, E. M. (2022). *Listeria monocytogenes* Pathogenesis: The Role of Stress Adaptation. *Microorganisms* 10, 1522. doi: 10.3390/microorganisms10081522
- Silhavy, T. J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Singh, D. D., and Datta, M. (2018). "Genomics," in *Omics Approaches, Technologies And*

- Applications: Integrative Approaches For Understanding OMICS Data*, eds. P. Arivaradarajan and G. Misra (Singapore: Springer Singapore). doi: 10.1007/978-981-13-2925-8
- Siscovick, D. S., Raghunathan, T., King, I., Weinmann, S., Bovbjerg, V. E., Kushi, L., et al. (2000). Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Am J Clin Nutr* 71, 208S–12S. doi: 10.1093/ajcn/71.1.208S
- Skandamis, P. N., and Jeanson, S. (2015). Colonial vs. planktonic type of growth: mathematical modeling of microbial dynamics on surfaces and in liquid, semi-liquid and solid foods. *Front Microbiol* 6, 1178. doi: 10.3389/fmicb.2015.01178
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., and Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology* 122, e59. doi: 10.1002/cpmb.59
- Sleator, R. D., Wemekamp-Kamphuis, H. H., Gahan, C. G. M., Abee, T., and Hill, C. (2005). A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 55, 1183–1195. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04454.x
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev* 40, 133–159. doi: 10.1093/femsre/fuv008
- Spickler, A. (2019). Listeriosis - Technical Factsheets. *The Center for Food Security & Public Health CFSPH*.
- Stein, H., Stessl, B., Brunthaler, R., Loncaric, I., Weissenböck, H., Ruczizka, U., et al. (2018). Listeriosis in fattening pigs caused by poor quality silage - a case report. *BMC Veterinary Research* 14, 362. doi: 10.1186/s12917-018-1687-6
- Strahl, H., and Errington, J. (2017). Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu Rev Microbiol* 71, 519–538. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095630
- Strimmer, K. (2008). fdrtool: a versatile R package for estimating local and tail area-based false discovery rates. *Bioinformatics* 24, 1461–1462. doi: 10.1093/bioinformatics/btn209
- Subramanian, C., Cuypers, M. G., Radka, C. D., White, S. W., and Rock, C. O. (2022). Domain architecture and catalysis of the *Staphylococcus aureus* fatty acid kinase. *J Biol Chem* 298, 101993. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101993
- Suutari, M., and Laakso, S. (1994). Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol* 20, 285–328. doi: 10.3109/10408419409113560
- Tabouret, M., de Rycke, J., and Dubray, G. (1992). Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. *J Gen Microbiol* 138, 743–753. doi: 10.1099/00221287-138-4-743
- Tan, M. F., Siow, C. C., Dutta, A., Mutha, N. V., Wee, W. Y., Heydari, H., et al. (2015). Development of

- ListeriaBase and comparative analysis of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics* 16, 755. doi: 10.1186/s12864-015-1959-5
- Tan, W. S., Budinich, M. F., Ward, R., Broadbent, J. R., and Steele, J. L. (2012). Optimal growth of *Lactobacillus casei* in a Cheddar cheese ripening model system requires exogenous fatty acids. *J Dairy Sci* 95, 1680–1689. doi: 10.3168/jds.2011-4847
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., et al. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 6, 377–382. doi: 10.1038/nmeth.1315
- Tasara, T., and Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J Food Prot* 69, 1473–1484. doi: 10.4315/0362-028x-69.6.1473
- Tasara, T., and Stephan, R. (2007). Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 269, 265–272. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00633.x
- Thévenot, D., Deline-Muller, M. L., Christeans, S., and Vernozy-Rozand, C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int J Food Microbiol* 102, 85–94. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2004.12.008
- Tiwari, K. B., Birlingmair, J., Wilkinson, B. J., and Jayaswal, R. K. (2015). Role of the twin-arginine translocase (tat) system in iron uptake in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 161, 264–271. doi: 10.1099/mic.0.083642-0
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., et al. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459, 950–956. doi: 10.1038/nature08080
- Tortora, G., Funke, B., and Case, C. (2018). *Introduction à la microbiologie*, ERPI.
- Touche, C., Hamchaoui, S., Quilleré, A., Darsonval, M., and Dubois-Brissonnet, F. (2023). Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane. *Food Microbiology* 110, 104170. doi: 10.1016/j.fm.2022.104170
- Truong, H.-N., Garmyn, D., Gal, L., Fournier, C., Sevellec, Y., Jeandroz, S., et al. (2021). Plants as a realized niche for *Listeria monocytogenes*. *MicrobiologyOpen* 10, e1255. doi: 10.1002/mbo3.1255
- Tyagi, S., and Kramer, F. R. (1996). Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat Biotechnol* 14, 303–308. doi: 10.1038/nbt0396-303
- Ubbink, J., Burbidge, A., and Mezzenga, R. (2008). Food structure and functionality: a soft matter

- perspective. *Soft Matter* 4, 1569–1581. doi: 10.1039/B802183J
- Vadyvaloo, V., Hastings, J. W., van der Merwe, M. J., & Rautenbach, M. (2002). Membranes of class Ila bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5223–5230. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5223-5230.2002>
- van de Beek, D., Brouwer, M. C., Thwaites, G. E., and Tunkel, A. R. (2012). Advances in treatment of bacterial meningitis. *Lancet* 380, 1693–1702. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61186-6
- Van Dijk, E., and Thermes, C. (2021). La révolution de la génomique : les nouvelles méthodes de séquençage et leurs applications. *Planet-Vie*. Available at: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-revolution-de-la-genomique-les-nouvelles-methodes-de> (Accessed July 24, 2024).
- Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P., et al. (1998). Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J Appl Microbiol* 85, 337–346. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00515.x
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vázquez-Boland, J. A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., and Goebel, W. (2001a). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection* 3, 571–584. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01413-7
- Vázquez-Boland, J. A., Kryptou, E., and Scotti, M. (2017). *Listeria* Placental Infection. *mBio* 8, e00949-17. doi: 10.1128/mBio.00949-17
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., et al. (2001b). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* 14, 584–640. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001
- Verheyen, D., and Van Impe, J. F. M. (2021). The Inclusion of the Food Microstructural Influence in Predictive Microbiology: State-of-the-Art. *Foods* 10, 2119. doi: 10.3390/foods10092119
- Verheyen, D., Bolívar, A., Pérez-Rodríguez, F., Baka, M., Skåra, T., and Van Impe, J. F. (2018). Effect of food microstructure on growth dynamics of *Listeria monocytogenes* in fish-based model systems. *Int J Food Microbiol* 283, 7–13. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.032
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., et al. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* 84, 377–410. doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04

- Vilchis-Rangel, R. E., Espinoza-Mellado, M. del R., Salinas-Jaramillo, I. J., Martinez-Peña, M. D., and Rodas-Suárez, O. R. (2019). Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker IIsX with invasiveness. *Curr Microbiol* 76, 637–643. doi: 10.1007/s00284-019-01671-2
- Vinothkumar, K. R., and Henderson, R. (2010). Structures of membrane proteins. *Q Rev Biophys* 43, 65–158. doi: 10.1017/S0033583510000041
- Vivant, A.-L., Garmyn, D., and Piveteau, P. (2013). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 87. doi: 10.3389/fcimb.2013.00087
- Walker, S. J., Archer, P., and Banks, J. G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol* 68, 157–162. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x
- Walland, J., Lauper, J., Frey, J., Imhof, R., Stephan, R., Seuberlich, T., et al. (2015). *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. *Schweiz Arch Tierheilkd* 157, 319–328. doi: 10.17236/sat00022
- Wang, J., Ray, A. J., Hammons, S. R., and Oliver, H. F. (2015). Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have inlA premature stop codons. *Foodborne Pathog Dis* 12, 151–158. doi: 10.1089/fpd.2014.1837
- Wang, L. L., and Johnson, E. A. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl Environ Microbiol* 58, 624–629. doi: 10.1128/aem.58.2.624-629.1992
- Wang, Y., Sun, L., Hu, L., Wang, Z., Wang, X., & Dong, Q. (2022). Adhesion and kinetics of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to nutritional stress. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 156, 111143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111143>
- Weis, J., and Seeliger, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* 30, 29–32. doi: 10.1128/am.30.1.29-32.1975
- Weiss, J., Loeffler, M., & Terjung, N. (2015). The antimicrobial paradox: Why preservatives lose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*, 4, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., and den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 286–292. doi: 10.1099/ijs.0.070839-0
- Welshimer, H. J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from Vegetation. *J Bacteriol* 95, 300–303.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Karatzas, A. K., Wouters, J. A., and Abee, T. (2002). Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature

- and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 68, 456–463. doi: 10.1128/AEM.68.2.456-463.2002
- Werbrouck, H., Botteldoorn, N., Uyttendaele, M., Herman, L., and Van Coillie, E. (2007). Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: optimization, evaluation and pitfalls. *J Microbiol Methods* 69, 306–314. doi: 10.1016/j.mimet.2007.01.017
- Wieczorek, K., Bomba, A., and Osek, J. (2020). Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of *Listeria monocytogenes* from Fish and Fish Production Environments in Poland. *Int J Mol Sci* 21, 9419. doi: 10.3390/ijms21249419
- Wiedmann, M. (2002a). Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 85, 524–532. doi: 10.1093/jaoac/85.2.524
- Wiedmann, M. (2002b). Subtyping of bacterial foodborne pathogens. *Nutr Rev* 60, 201–208. doi: 10.1301/00296640260184273
- Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., and Watecka-Zacharska, E. (2023). Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*—overview of selected aspects. *Front. Mol. Biosci.* 10. doi: 10.3389/fmolb.2023.1161486
- Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Watecka-Zacharska, E., Korkus, J., and Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to the Stress Factors in the Food Processing Environment. *Front Microbiol* 12, 710085. doi: 10.3389/fmicb.2021.710085
- Williams, T., Bauer, S., Beier, D., and Kuhn, M. (2005). Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. *Infect Immun* 73, 3152–3159. doi: 10.1128/IAI.73.5.3152-3159.2005
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., et al. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275–289. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00660-2
- Wimpenny, J. W., Leistner, L., Thomas, L. V., Mitchell, A. J., Katsaras, K., and Peetz, P. (1995). Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *Int J Food Microbiol* 28, 299–315. doi: 10.1016/0168-1605(95)00065-8
- Wishart, D. S., Han, S., Saha, S., Oler, E., Peters, H., Grant, J. R., et al. (2023). PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res* 51, W443–W450. doi: 10.1093/nar/gkad382
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (2013). Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques* 54, 314–320. doi: 10.2144/000114043

- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., and Abee, T. (2000). The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst Appl Microbiol* 23, 165–173. doi: 10.1016/S0723-2020(00)80001-6
- Yao, J., and Rock, C. O. (2017). Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie* 141, 30–39. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.015
- Yao, J., Ericson, M. E., Frank, M. W., and Rock, C. O. (2016). Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase I (FabI) Is Essential for the Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 84, 3597–3607. doi: 10.1128/IAI.00647-16
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
- Yue, S. T., Singer, V. L., Roth, B. L., Mozer, T. J., Millard, P. J., Jones, L. J., et al. (1997). Substituted unsymmetrical cyanine dyes with selected permeability. Available at: <https://patents.google.com/patent/US5658751A/en> (Accessed July 3, 2024).
- Zambiasi, R. C., Przybylski, R., Zambiasi, M. W., and Mendonca, C. B. (2007). Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *B. ceppa, curitiba* 25, 111–120.
- Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2008a). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 222–233. doi: 10.1038/nrmicro1839
- Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2008b). Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res* 49, 1867–1874. doi: 10.1194/jlr.R800005-JLR200
- Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2009). Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J Lipid Res* 50 Suppl, S115–119. doi: 10.1194/jlr.R800046-JLR200
- Zhang, Y.-M., White, S. W., and Rock, C. O. (2006). Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 281, 17541–17544. doi: 10.1074/jbc.R600004200
- Zheng, C. J., Yoo, J.-S., Lee, T.-G., Cho, H.-Y., Kim, Y.-H., and Kim, W.-G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 579, 5157–5162. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.028
- Zhu, K., Ding, X., Julotok, M., and Wilkinson, B. J. (2005). Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C15:0 fatty acid required for low-temperature growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 71, 8002–8007. doi: 10.1128/AEM.71.12.8002-8007.2005
- Zou, Q., Dong, H., Zhu, L., and Cronan, J. E. (2022). The *Enterococcus faecalis* FabT Transcription Factor Regulates Fatty Acid Biosynthesis in Response to Exogeneous Fatty Acids. *Front*

*Microbiol* 13, 877582. doi: 10.3389/fmicb.2022.877582



# ANNEXES

---

# Annexe 1 – Article : analyse préliminaire de l'effet des acides gras exogènes sur le phénotype de *Listeria monocytogenes*

---

Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane

Publication acceptée dans *Food Microbiology*

Avril 2023

Cécile TOUCHE, Sarah HAMCHAOUÏ, **Aurore QUILLERÉ**, Maud DARSONVAL,  
Florence DUBOIS-BRISSONNET

Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

Citation: Touche, C., Hamchaoui, S., **Quilleré, A.**, Darsonval, M., and Dubois-Brissonnet, F. (2023). Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane. *Food Microbiology* 110, 104170. doi: [10.1016/j.fm.2022.104170](https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104170)

## Abstrat

*Listeria monocytogenes* is a psychrotrophic food-borne pathogen mostly associated with consumption of ready-to-eat foods. Due to its high prevalence in raw materials, it is fundamental to control its growth at low temperature. In lipid-rich products, fatty acids can be heterogeneously distributed in the food matrix and can be present in the environment immediately surrounding the pathogen. In this study, we sought to understand the impact of exogenous fatty acids on the growth and membrane physiology of *L. monocytogenes* according to the temperature and strain. We demonstrate that exogenous unsaturated fatty acids promote the growth of *L. monocytogenes* at 5°C but not at 37°C. The level of growth modifications is dependent upon the strain. At 5°C, there is high incorporation of unsaturated fatty acids, which decreases the weighted-average melting temperature of membrane fatty acids allowing *L. monocytogenes* to compensate for the decrease in fluidity caused by the temperature, thus leading to increased growth. In contrast, the incorporation of saturated fatty acids decreases membrane fluidity and prevents growth at 5°C. This study underlines the absolute necessity to understand better the cold adaptation of *L. monocytogenes* in lipid-rich foods in order to adjust their shelf-life and guarantee their microbiological safety.

**Keywords:** Exogenous fatty acids; Growth promotion; Cold adaptation; Fatty acid incorporation; Shelf-life compromising

## Abbreviations

FA fatty acids

#FA exogenous fatty acids

FAME fatty acid methyl esters

SFA saturated fatty acids

i-BFA iso-branched fatty acids

ai-BFA anteiso-branched fatty acids

UFA unsaturated fatty acids

SCFA short-chain fatty acids

GC-MS gas chromatography coupled with mass spectrometry

RTE ready-to-eat

WAMT weighted-average melting temperature

## 1. Introduction

Infectious foodborne diseases remain a real public health issue worldwide. In 2019, more than 320,000 human cases due to zoonoses were reported in Europe (EFSA, 2021). Among them, *L. monocytogenes* caused 2,621 invasive human cases which confirms a stable trend since 2015 after a long period of increasing trend. Invasive listeriosis causes the highest rate of case fatality (17.6%) compared to other zoonoses (EFSA, 2021). The ubiquitous nature of *L. monocytogenes* leads to its high prevalence in many raw materials and its persistence in the whole food chain. Consequently, its prevalence in ready-to-eat (RTE) foods is also high at the processing stage, in particular for fish production (5.8%) (EFSA, 2021). Ready-to-eat (RTE) foods are highly concerned because they are typically stored at low temperature which allows the growth of *L. monocytogenes* and they don't receive any subsequent treatment that could inactivate it before consumption. Regulation (EC) No. 2073/2005 defines a limit at the

retail stage of 100 CFU/g ( $n = 5$ ,  $c = 0$ ) for RTE foods that are able to support the growth of *L. monocytogenes*. Nevertheless, more than 90% of listeriosis cases were caused by ingestion of RTE foods containing more than 2,000 CFU/g, which is significantly above this regulation limit (Ricci et al., 2018).

Therefore, control of product safety regarding listeriosis risk mainly lies in control of pathogen growth at low temperature. When microorganisms are exposed to temperatures out of their "comfort zone" they have to adapt to counteract the effects of temperature on their cellular components (Booth, 2002). The cold adaptation response is a universal bacterial mechanism, which has been particularly studied in psychrotrophic bacteria such as *B. cereus* and *L. monocytogenes* (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Loss of membrane fluidity is the first consequence faced by cells when the temperature decreases. At a given temperature, membrane fluidity and permeability depend on lipid acyl chain composition (Parsons and Rock, 2013). To sustain optimum membrane fluidity and survive in harsh environments such as sub-optimal temperatures or in the presence of toxic compounds, bacterial cells can alter the acyl chain structure of membrane glycerophospholipids depending on their biosynthesis pathway systems. Several adaptations can be made, such as changing the ratios of: 1) saturated (SFA) versus unsaturated fatty acids (UFA), 2) *cis* to *trans* UFA, 3) branched (BFA) versus non-branched FA, changing 4) acyl chain length, and 5) synthesizing cyclopropane FA from UFA (Denich et al., 2003). At low temperature, *L. monocytogenes* adapts its membrane composition by increasing the ratio of *anteiso/iso* branched chain fatty acids (*ai*-BFA/*i*-BFA) and/or by shortening the FA chain length, both of which counterbalance the physical loss of fluidity (Julotok et al., 2010; Mastronicolis et al., 1998, 2005; Neunlist et al., 2005).

Beside this intrinsic bacterial ability to adapt to harsh environments, several compounds in the environment could help bacteria to overcome stressful conditions. For instance, osmo-protective compounds present in food products, namely betaine in vegetables and carnitine in meats, are taken up by *L. monocytogenes* and favor its

growth at 4°C (Tasara and Stephan, 2006). Moreover, several studies have shown that numerous bacteria could use exogenous FA from the environment to adapt their membrane composition (Ando et al., 1992; Brinster et al., 2009, 2010). In particular, *B. cereus* was shown to insert fatty acids from spinach in its membrane at low temperature under anaerobiosis and thus to recover the same maximal population density as at optimal temperature (de Sarrau et al., 2013). Here, we studied the impact of different types of FA (UFA, SFA) available in the environment on the growth of *L. monocytogenes* and on its membrane physiology according to temperature and strain.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Myristic acid (C14), palmitic acid (C16), oleic acid (C18:1cis9), linoleic acid (C18:2w6) and linolenic acid (C18:3w6) were from Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden). Solutions were obtained by dispersion of the specific FA in a bovine serum albumin (BSA) solution in phosphate buffer pH 8. The final concentrations in the culture medium were 0.045 mM FA in 0.05% BSA.

### 2.2. Bacterial strains and storage

The strains of *Listeria monocytogenes* used in this study were EGD-e (Murray et al., 1926), CNL895805 (Van Langendonck et al., 1998) and seven other strains isolated from foods (Table A). The full names of the strains (e.g. Lm\_b3d\_208) were shortened in the text (e.g. Lm208) to simplify the reading. Stock cultures of *L. monocytogenes* were kept in Tryptone Soya Broth (TSB) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with 20% (v/v) glycerol at 80°C.

**Table A.** *L. monocytogenes* strains used in this study

Strain code	Origin	Serotype	CC
EGD-e	Guinea pig	1/2a	CC9
Lm_b3d_208 (CNL 895805)	Sheep's brain	1/2a	CC7
Lm_b3d_226	Milk	4	CC1
Lm_b3d_540	Ham sandwich	1/2a	-
Lm_b3d_541	Eggs & tuna sandwich	1/2a	CC121
Lm_b3d_543	Raw salmon	1/2a	CC121
Lm_b3d_551	Duck foie gras	1/2c	CC9
Lm_b3d_553	Smoked salmon	3a	CC121
Lm_b3d_554	Slices of bacon	3a	CC121
Lm_b3d_562	Raw sheep's milk	-	CC19

### 2.3. Culture conditions

The strains were inoculated in TSB at 1% v/v with a standardized inoculum ( $\sim 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>) obtained after two subcultures at 30°C in the same broth. Cultures were then grown in 100-well microplates (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland) or 20 mL flasks. When indicated, the medium was supplemented by a specific exogenous FA (#FA) solution.

Bacterial growth was followed for 48 h at 37°C, 6 days at 8°C and 15 days at 5°C by measuring the optical density (OD) at 600 nm in microplates in an automatic spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland) or discontinuously in 20 mL flasks (spectrophotometer Genesis 30, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The addition of 0.05% BSA in TSB was shown to have no significant effect on the growth rate of *L. monocytogenes* at 5°C ( $0.045 \pm 0.004$  h<sup>-1</sup> versus  $0.042 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>).

### 2.4. Determination of the growth rate

Maximum specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) of *L. monocytogenes* were estimated from the OD growth kinetics by fitting the modified Gompertz model (Guillier et al., 2007; Pernin et al., 2018) using the complementary macro SolverAid (de Levie, 2012).

### 2.5. Shelf-life alteration in the presence of exogenous FA

Growth simulations were performed to evaluate the impact of the presence of exogenous FA on shelf-life, which is here considered to be the time when the population reaches 100 *L. monocytogenes*/g. Five thousand values of growth rates

were calculated with the statistical function NORMINV(RAND (),M,SD) which was used to return the inverse of the normal distribution from the experimentally determined mean (M) and standard deviation (SD) of  $\mu_{max}$  for each condition (see 2.4). The lag time was calculated from each of the 5,000 growth rate values with the following relation by assuming that the physiological state (K) is at the average value of 2.5 (Augustin et al., 2011):

$$K = \mu_{max} \cdot lag \quad (1)$$

Five thousand simulations of growth curves were then performed for each condition using the Gompertz growth model with the following parameters: the growth rate ( $\mu_{max}$ ), the lag time (*lag*), the initial contamination ( $N_0$ ) and the final population ( $N_f$ ). The initial and final populations were respectively set at 1 and  $10^9$  CFU/g. The mean and standard deviation of the shelf-life were calculated from the 5,000 growth simulations in each condition.

## 2.6. Membrane fatty acid analysis

Bacterial cultures grown as described above were harvested by centrifugation (7,000 g, 20°C) in the early stationary phase according to OD growth curves. Pellets were washed twice with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (Brinster et al., 2009). Extraction and methylation of FA were carried out directly on bacterial pellets as previously described (Dubois-Brissonnet et al., 2016; M échin et al., 1999). FA of whole cells were first saponified and esterified by methanolic NaOH and methanolic HCl (1st step: 1 mL NaOH 3.75 M in 50% v/v methanol solution for 30 min at 100°C; 2nd step addition of 2 mL HCl 3.25 M in 45% v/v methanol solution for 10 min at 80°C). Fatty acid methyl esters (FAME) were extracted with a diethyl ether/cyclohexane solution (1:1 v/v). The organic phase was then washed with a dilute base (NaOH 0.3 M). Analytical gas chromatography of FAME was carried out on a GC-MS Trace 1300/ISQ 7000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) equipped with a BPX70 capillary column (25 m, 0.22 mm id) (SGE, Victoria, Australia). Column temperature was set at 100°C for 1 min and then increased to 170°C at the rate of 2°C/min.



FAME were expressed as a percentage of the total area and grouped in classes: saturated fatty acids (SFA), unsaturated fatty acids (UFA), *iso* and *anteiso* branched-chain fatty acids (*i*-BFA and *ai*-BFA). Additional indicators of membrane adaptation were also calculated, namely short chain fatty acid (<C15) contents (SCFA) and weighted-average melting temperature (WAMT). The latter is calculated from the melting temperature of each individual FA and its ratio in the membrane composition (Seel et al., 2018).

$$\text{WAMT } (^{\circ}\text{C}) = \sum_n^1 T_i \cdot \text{FA } (\%)_i \quad (2)$$

where  $T_i$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is the melting temperature of  $\text{FA}_i$ ,  $\text{FA } (\%)_i$  is the percentage of  $\text{FA}_i$ , and  $\text{FA}_1$  to  $\text{FA}_n$  are each of the FA present in the membrane composition. Melting temperatures of FA ( $^{\circ}\text{C}$ ) were obtained from CAS Common Chemistry (<https://commonchemistry.cas.org/>).

## 2.7. Statistics

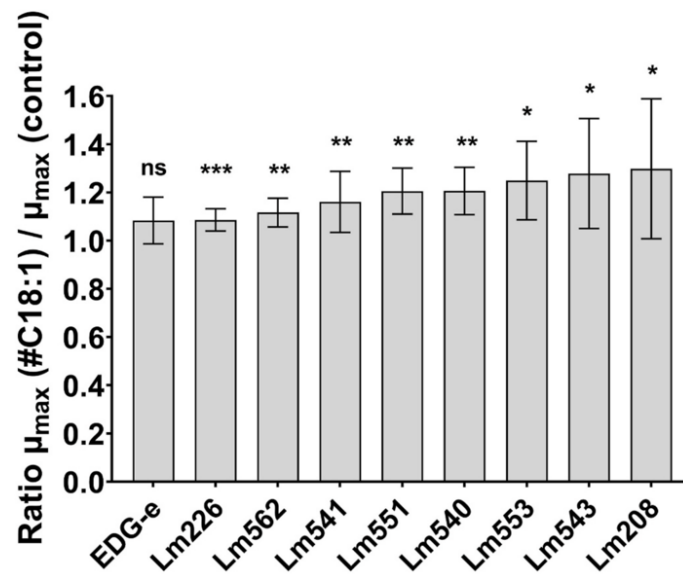
The number of replicates is specified in the legend of each figure. All experiments were conducted at least in triplicate with independent subcultures. Statistical analyses were performed using GraphPad Software 9.2.0 (Prism, USA). Two-tailed paired Student's t-tests were performed between #C18:1 and control for each strain in Figure A. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison tests (95% confidence interval) were performed between the different conditions and the control for each strain and temperature in Figs. 2 and 4–6. According to the pvalue, results are reported as non-significant (ns) or significantly different \* if  $p < 0.0332$ ; \*\* if  $p < 0.0021$ ; \*\*\* if  $p < 0.0002$ ; \*\*\*\* if  $p < 0.0001$ .

## 3. Results

### 3.1. The medium supplementation with oleic acid promotes the growth of several strains of *L. monocytogenes* at 8°C but not at the same level

We first aimed to study the growth of nine different strains of *L. monocytogenes* at 8°C in TSB supplemented or not with oleic acid (#C18:1). The growth rates at 8°C

without supplementation (control) varied among the different strains, ranging from  $0.060 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$  to  $0.088 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ . Except for EGD-e, the growth rate of *L. monocytogenes* in #C18:1 medium was always significantly higher than that of the control. The ratio  $\mu_{\max}(\#C18:1)/\mu_{\max}(\text{control})$  was ranging from  $1.1 \pm 0.09 \text{ h}^{-1}$  for EGD-e to  $1.3 \pm 0.29 \text{ h}^{-1}$  for Lm208 (Figure I). EGD-e and Lm208, which respectively showed the lowest and highest increase of growth rate in #C18:1 medium, were chosen for further experiments.



**Figure I.** Ratios of growth rates at 8°C of nine different strains of *L. monocytogenes* in TSB with C18:1 supplementation or without [Ratio =  $\mu_{\max}(\#C18:1)/\mu_{\max}(\text{control})$ ]. Mean and standard deviation ( $n = 6$ ) are represented. Growth rates in both conditions were compared for each strain by twotailed paired Student's t-tests (95% confidence interval).

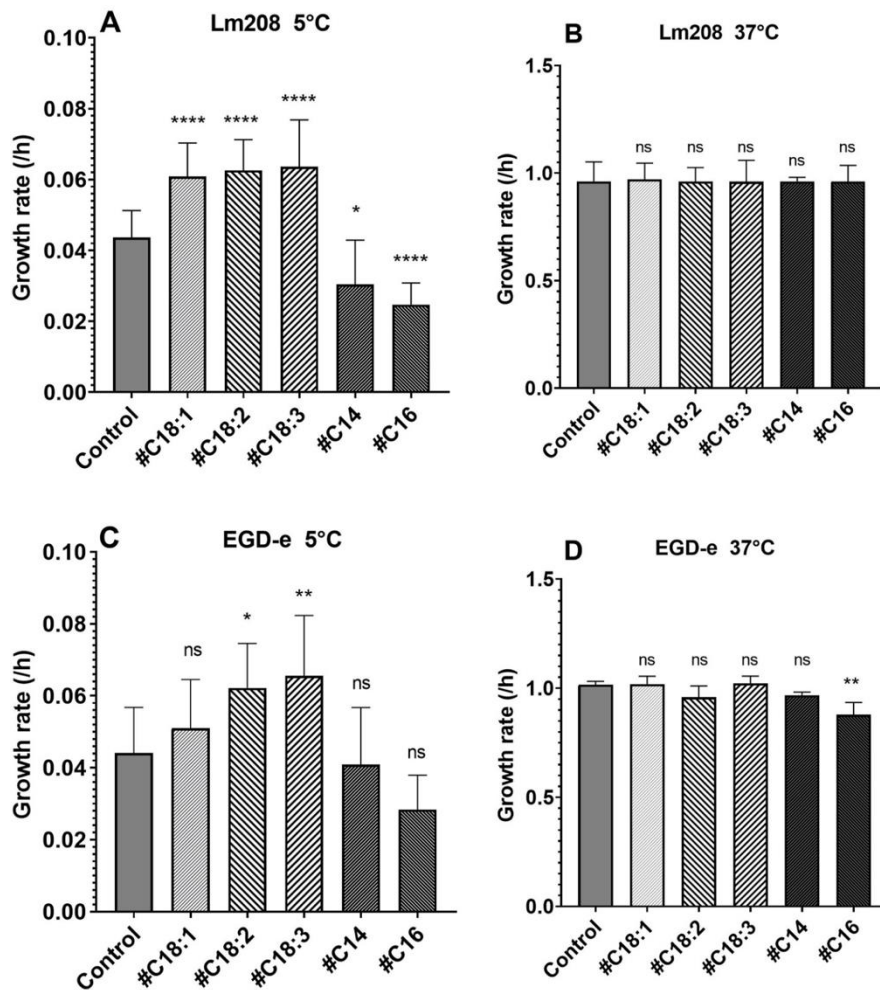
### 3.2. The level of growth promotion depends on the type of exogenous fatty acid and on temperature

The growth of strains EGD-e and Lm208 was followed at 5°C or at 37°C in medium supplemented with different SFA, namely myristic acid (#C14) or palmitic acid (#C16) or different UFA, namely oleic acid (#C18:1), linoleic acid (#C18:2) or linolenic acid (#C18:3). Stearic acid (C18) was not used in this study because of the lack of efficiency in dispersing this FA in BSA solution. At 5°C, the growth rates in control conditions for EGD-e and Lm208 were similar, being respectively  $0.044 \pm 0.013 \text{ h}^{-1}$  and  $0.044 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$  (Figure II.A and II.C).

With UFA supplementation, the growth rate of Lm208 significantly increased and the ratio  $\mu_{\max}(\#UFA)/\mu_{\max}(\text{control})$  was above 1.4 (Figure II.A). Supplementation with #C18:1 increased EGD-e growth rate slightly, but not significantly, as previously observed at 8°C (see 3.1). Nevertheless, #C18:2 or #C18:3 supplementations led to a significant increase of EGD-e growth rate at 5°C (Figure II.C).

Supplementation with SFA led to a significant decrease of the growth rate at 5°C for Lm208 and the ratio  $\mu_{\max}(\#UFA)/\mu_{\max}(\text{control})$  was 0.7 for #C14 and 0.6 for #C16 (Figure II.A). A slight but non-significant decrease was also observed in EGD-e growth rate with these supplementations (Figure II.C).

We analyzed the impact of temperature by following the growth of both strains in the same supplemented media at 37°C. The growth rates in control conditions for Lm208 and EGD-e were respectively  $0.961 \pm 0.091 \text{ h}^{-1}$  and  $1.015 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$  (Figure II.B and 2.D). Whatever the supplementation and strain, no significant differences were recorded in growth rates at 37°C, except for a significant decrease observed for the #C16 EGD-e culture (Figure II.D).

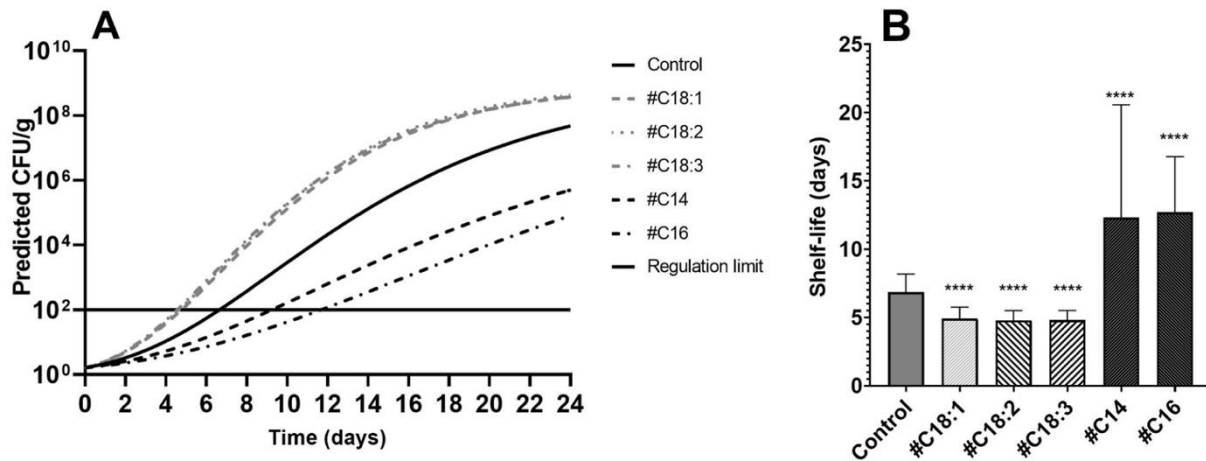


**Figure II.** Growth rates at 5 °C (A and C) and 37°C (B and D) of *L. monocytogenes* Lm208 (A and B) and EGD e (C and D) with #C18:1,#C18:2, #C18:3, #C14, or #C16 supplementation or without (control). Mean and standard deviation (n = 6 to 18) are represented. Growth rates were analyzed in comparison with the control by Dunnett’s one way ANOVA (95% confidence interval).

### 3.3. Shelf-life predictions under FA supplementations

The mean of the 5,000 growth simulations performed from the experimental values of growth rates in cultures without supplementation (Control) or with supplementations are plotted in Figure III.A. The mean and standard deviation of the shelf-life, considered as the time when the population reaches 100 *L. monocytogenes*/g, is represented in Figure III.B. Without supplementation, the population reached 100 CFU/g in  $6.9 \pm 1.3$  days.

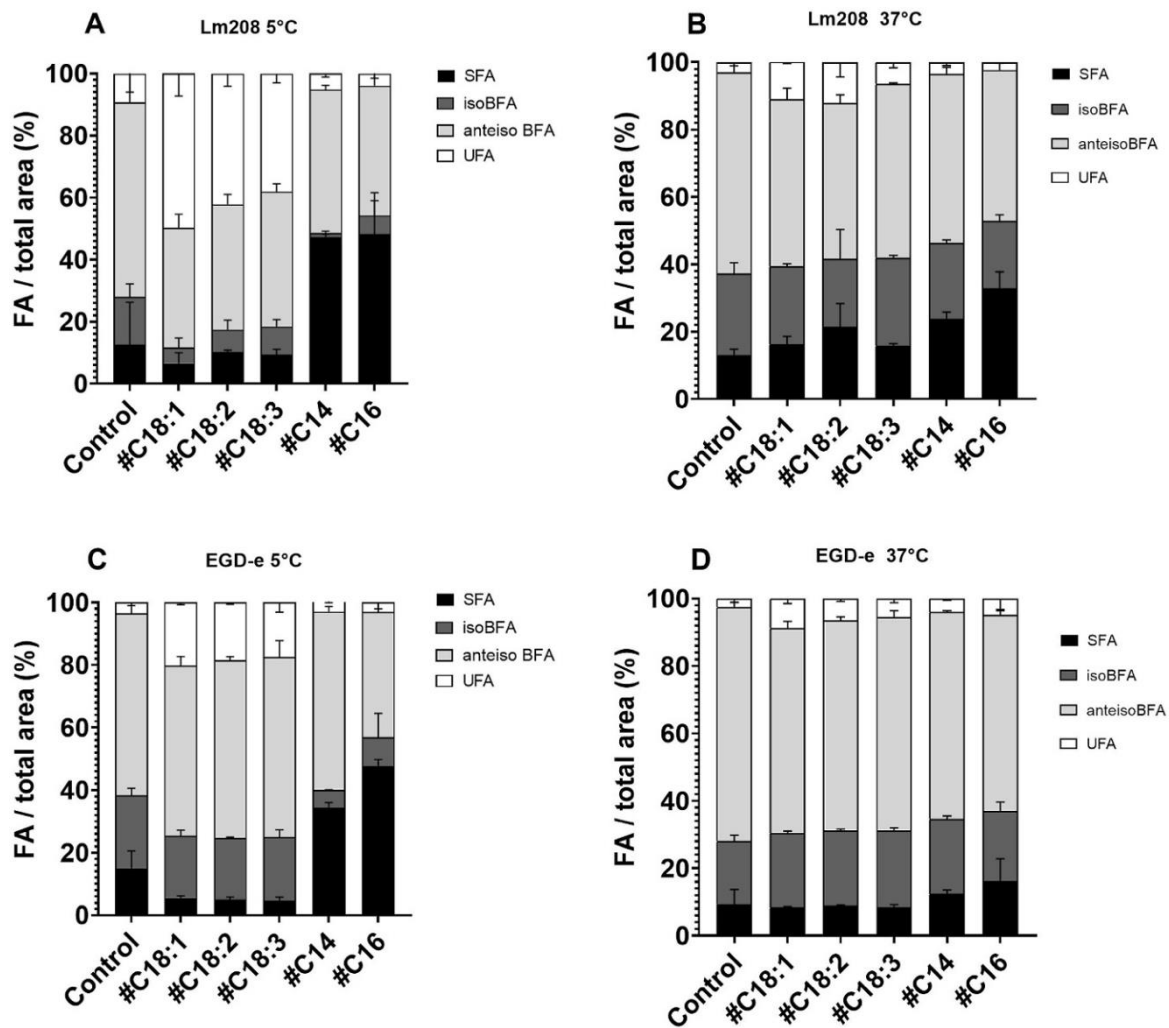
The shelf-life is significantly lower in #UFA ( $4.9 \pm 0.8$  days in #C18:1,  $4.8 \pm 0.7$  days #C18:2 and #C18:3) and higher in #SFA ( $12.3 \pm 8.2$  days in #C14 and  $12.7 \pm 4.1$  days in #C16) than in control cultures (Figure III.B).



**Figure III.** Growth simulations of CFU/g over time (A) and shelf life (B) in TSB at 5°C with supplementations or without (Control). Mean of growth curves and mean and standard deviation of shelf-life are presented. 5,000 simulations were processed considering that  $N_0$  was 1 CFU/g, K was 2.5 and the growth rate follows a normal distribution around the experimentally determined mean and standard deviation of  $\mu_{max}$  for each condition. Shelf-lives were analyzed in comparison with the control by Dunnett's one way ANOVA (95% confidence interval).

### 3.4. The level of incorporation of exogenous FA by *L. monocytogenes* depends upon the strain, temperature and type of FA

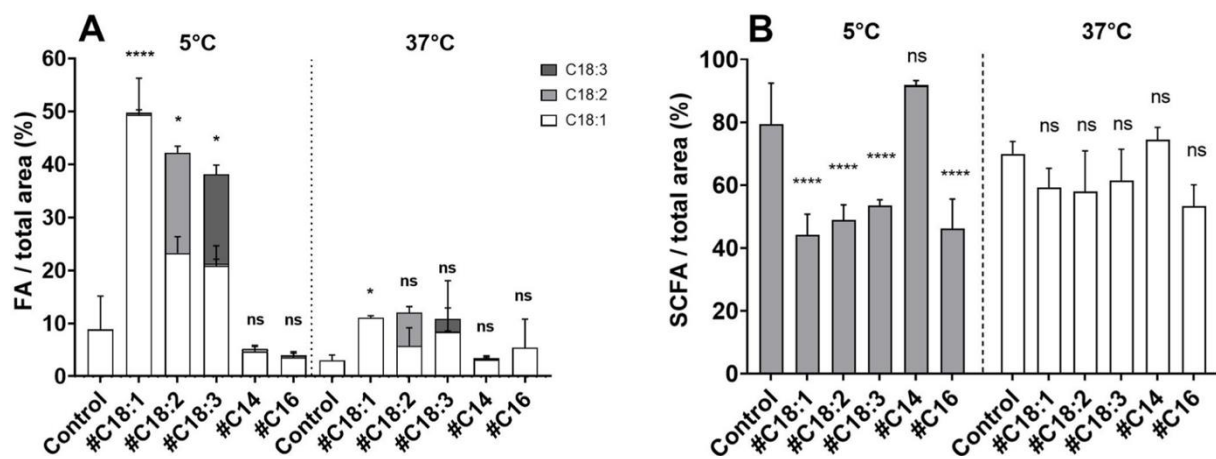
The FA composition of *L. monocytogenes* mainly consists of BFA with *i*-BFA (*i*-C14, *i*-C15, *i*-C16, *i*-C17) and *ai*-BFA (*ai*-C13, *ai*-C15, *ai*-C17) (Figure IX). The three most abundant BFA in both strains at both temperatures are *ai*-C15, *i*-C15 and *ai*-C17. At 37°C in control conditions, BFA represent 84% of the membrane FA of Lm208, SFA (C12, C14, C15, C16, C18) represent 13% of the composition and UFA (*cis*9 C18:1) 3% (Figure 4B). At 5°C, total BFA and SFA respectively decreased to 78.1% and 12.6% and UFA increased to 9.3% (Figure IX.A).



**Figure IX.** Fatty acid composition expressed in 4 FA categories(SFA, i BFA, ai BFA and UFA) of *L. monocytogenes* Lm208 (A and C) and EGD e (B and D) at 5°C (A and B) and 37°C (C and D) with #C18:1,#C18:2, #C18:3, #C14, or #C16 supplementation or without (control). Mean and standard deviation (n = 3 to 6) are represented

Medium supplementation with exogenous FA induced modifications in membrane FA composition, but differently according to the strain, temperature and type of FA. In the case of #UFA supplementations at 37°C, UFA in Lm208 membrane composition was respectively 11%, 12% and 10.8% for #C18:1, #C18:2 and #C18:3 in comparison with 3% in the control (Figure IX.B). At 5°C, levels of UFA were much higher in the membrane, reaching respectively 49.7%, 42.1% and 38.1% for #C18:1, #C18:2 and #C18:3 in comparison with 9% in the control (Figure IX.A). Moreover, the supplementation with C18:2 or C18:3 induced a significant increase in C18:1 together with the supplemented FA at 5°C (Figure IX.A). At both temperatures, Lm208

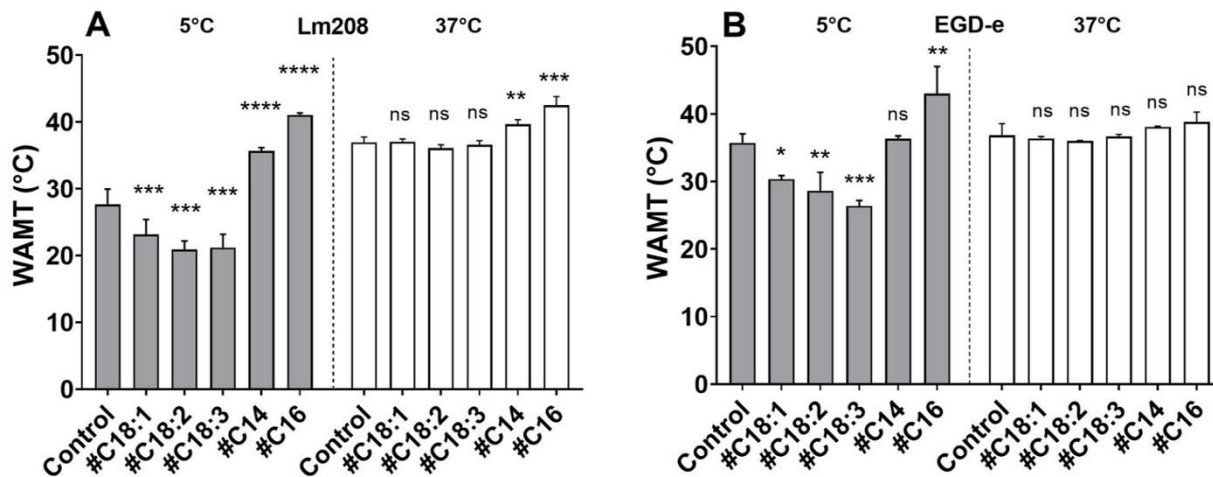
membrane composition in SFA was not significantly different between #UFA cultures and control (Figure IX.A and IX.B). With #SFA supplementations, the level of SFA in Lm208 membrane significantly increased. In #C14, the membrane contained 17.1% of C14 versus 4.6% in the control at 37°C and 44% versus 1% at 5°C (Figure IX.A et IX.B). Similarly, in #C16 cultures, it contained 30.3% of C16 versus 6.2% in the control at 37°C and 45.9% versus 2.1% at 5°C. In contrast, UFA were not significantly different from the control in #SFA cultures (Figure X.A). Short-chain FA (below C15) of Lm208 were also impacted by these FA supplementations (Figure V.B). In the control, SCFA increased at 5°C compared to 37°C. At 5°C in UFA and C16 supplemented cultures, SCFA significantly decreased in comparison to the control. C14 supplementation induced no significant change even though C14 belongs to SCFA, which suggests a decrease in de novo synthesized SCFA (Figure V.B).



**Figure V.** Fatty acid composition in unsaturated FA (C18:1, C18:2 and C18:3) (A) and in short-chain FA (C < 15) (B) at 5 °C and 37 °C of *L. monocytogenes* Lm208 with #C18:1, #C18:2, #C18:3, #C14, or #C16 supplementation or without (control). Mean and standard deviation (n = 3 to 6) are represented. FA were analyzed in comparison with the control by Dunnett's one-way ANOVA (95% confidence interval).

The WAMT of Lm208 membrane FA was lower at 5°C than at 37°C in control cultures (Figure VI.A). The WAMT in #UFA cultures was significantly lower to that in the control at 5°C, whereas it was similar at 37°C. It was significantly higher in #SFA cultures at both temperatures (Figure VI.A).

The EGD-e strain behaved the same way as Lm208 even though #UFA incorporation was less effective at both temperatures, but especially at 5°C (Figure V.C and 4.D). The same trends for WAMT adaptation were observed with EGD-e as with Lm208, but to a lesser extent (Figure VI.B).



**Figure VI.** Weighted-average melting temperature of the membrane fatty acids of *L. monocytogenes* Lm208 (A) and EGD-e (B) at 5 °C and 37 °C with #C18:1, #C18:2, #C18:3, #C14, or #C16 supplementation or without (control). Mean and standard deviation (n = 3 to 6) are represented. WAMT were analyzed in comparison with the control by Dunnett's one-way ANOVA (95% confidence interval).

#### 4. Discussion

In RTE foods, food safety is mainly controlled by preventing *L. monocytogenes* from growing at low temperature and from reaching 100 CFU/g at the end of the shelf-life. Food matrices are heterogeneous systems where microorganisms encounter several types of microstructures and gradients of available resources or inhibitors (Brocklehurst et al., 1995; Malakar et al., 2000). In lipid-rich foods, in particular, available FA could be heterogeneously distributed and unequally available for bacterial contaminants. Thus, we explored in this study the impact of different types of exogenous FA on *L. monocytogenes* growth and membrane adaptation at low temperature.

First, nine strains isolated from different food sources were cultivated in the presence or absence of oleic acid at 8°C. This UFA is in high proportion in many foods products including vegetable oils, such as olive (76% of total FA), peanut (48.7% of total



FA) and sunflower (15.3% of total FA) oils, which are commonly used in salad sauces or other RTE preparations (Zambiasi et al., 2007). Compared to the other strains, Lm540, Lm553 and Lm208 showed the greatest increase of growth rate in the presence of oleic acid. These strains were respectively isolated from raw or smoked salmons and from sheep brain. We hypothesize that these three strains are habituated to lipid-rich media containing UFA, respectively salmon (about 30.5% of UFA) (Horn et al., 2018) and sheep brain phospholipids (more than 37% UFA) (Palmer et al., 1985).

Thereafter, we aimed to evaluate the impact of several UFA and SFA on the growth of Lm208 and EGD-e at 5°C or 37°C. We demonstrated that UFA supplementations generally induced a significant increase of growth rate at 5°C in contrast to SFA supplementations. Free SFA or UFA are both generally known as antimicrobial agents. Straight-chain FA inhibit the growth of *S. aureus* and other Gram-positive bacteria, lauric acid being the most active FA (Kabara et al., 1972; Kelsey et al., 2006). UFA, including C16:1, C18:1, C18:2 and C18:3, also show anti bacterial activity (Kabara et al., 1972), which could be attributed to the ability of these molecules to interact with the membrane, to create pores and to affect the production of energy (Desbois and Smith, 2010). Nevertheless, scarce studies have described a positive impact of FA on bacterial growth, in particular at low temperature. The addition of the apolar phase of spinach to *B. cereus* cultures allows bacterial growth at low temperature without oxygen (de Sarrau et al., 2013). Addition of Tween 80 (containing esterified oleic acid) to a growth medium composed of cheddar cheese extract results in a significant increase in the final cell density of *Lactobacillus casei* at 8°C (Tan et al., 2012). Moreover, a very recent study shows that, similarly to our results, C18:1 and C18 supplementations, by Polysorbate 80 and Polysorbate 60, respectively increase and decrease the growth of *L. monocytogenes* at low temperature (6°C) (Flegler et al., 2022). Unlike what occurred at low temperature, we found no significant modifications of bacterial growth rate at 37°C, whatever the supplementation (UFA or SFA). Similarly, growth patterns of *E. coli* in minimal media supplemented with exogenous UFA at 37°C are similar to the control patterns (Herndon et al., 2020). In contrast, supplementation

with Polysorbate 80 or Polysorbate 60 results in little increase in the growth rate of *L. monocytogenes* at 37°C (Flegler et al., 2022).

The increased growth rate we have demonstrated with UFA supplementation can compromise shelf-life. According to growth simulations, two days of shelf-life are lost when UFA are available in the growth environment. UFA are present in numerous food matrices, in particular fish, such as salmon, and sauces containing vegetable oils. Moreover, the FA profile of food products tends to be modified nowadays in favor of UFA at the expense of SFA, so as to respect nutritional recommendations (INRA, 2013). FA in complex foods generally occur in esterified forms such as surfactants (Polysorbates), phospholipids, or triglycerides but plant, animal or bacterial lipases can partially break them down into free FA. Polysorbates, phospholipids or free FA can be dispersed in the aqueous phase, but not triglycerides which are trapped in emulsions. According to their localization and to their ability to get in contact with bacteria, lipids and FA can potentially have different levels of impact on *L. monocytogenes* growth. Studies investigating the influence of lipid content on the growth parameters of *L. monocytogenes* in complex foods are scarce. Most have been conducted in model emulsified systems, in which oil droplets structure the medium from liquid to solid according to the percentage of fat and where most of the lipids are inside droplets and thus are not in contact with the bacteria. In this type of emulsion, the presence of fat droplets was shown to increase the  $\mu_{\max}$  of *L. monocytogenes* at 4°C, though the authors could not explain why (Verheyen et al., 2018). We can hypothesize that some free UFA could be dispersed in the aqueous phase during the emulsifying process and could impact the growth of *L. monocytogenes*.

In order to further understand the impact of UFA on the growth of *L. monocytogenes*, we explored bacterial membrane FA composition. The membrane of the two strains of *L. monocytogenes* is composed of SFA, BFA and UFA, as already shown in several studies (Annous et al., 1997; Rogiers et al., 2017). Despite UFA synthesis is not described in *L. monocytogenes*, many studies found them in small

proportions in its membrane when grown without UFA supplementation (Bisbiroulas et al., 2011; Hingston et al., 2017; Mastronicolis et al., 2010; Püttmann et al., 1993). We could hypothesize that C18:1 could be incorporated from trace C18:1 present in the culture medium, even though we could not detect any UFA in the medium alone (data not shown). Another hypothesis is that the membrane UFA could be converted from corresponding SFA by a desaturase. *B. cereus* produces two acyl-lipid desaturases, DesA and DesB, creating double bonds in the FA chain in positions 5 and 10, respectively (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Hingston et al. (2017) suggest that a desaturase-like system exists in *L. monocytogenes* that could convert C16:0 to C16:1 and C18:0 to C18:1. They made this assertion based on the fact that UFA levels in the membrane decreased when *L. monocytogenes* was treated with a desaturase inhibitor (Vadyvaloo et al., 2002).

Low temperature induces modifications in FA composition of *L. monocytogenes* such as the shortening of FA length, the switching of branching from i- to ai-BFA and the increase in UFA. These well-known membrane modifications tend to counterbalance the physical reduction of membrane fluidity due to low temperature by synthesizing FA with lower melting point temperatures (Annous et al., 1997; Hingston et al., 2017).

When both studied strains of *L. monocytogenes* were cultivated in FA supplemented medium, their membrane composition was impacted by the incorporation of exogenous FA. Consistent with our study, it was shown that exogenous FA are incorporated in the membrane phospholipids of *L. monocytogenes* (Flegler et al., 2022). This FA incorporation is concomitant with a decrease of SFA and BFA synthesis which could save bacterial energy. FA incorporation was here shown to be strain- and temperature-dependent (higher in Lm208 than in EGD-e and higher at 5°C than at 37°C), but not selective regarding the type of FA. Indeed, every exogenous FA that we made available in the medium was incorporated. Nevertheless, the consequences of this incorporation are different according to the type of FA. When UFA are available in

the medium at low temperature, their great uptake dramatically decreases the WAMT of the membrane FA. Although the melting temperature of the cytoplasmic membrane also depends on the total polar lipid structure, this parameter can be considered as an indicator for membrane fluidity (Seel et al., 2018). The decrease of WAMT due to UFA incorporation probably allows *L. monocytogenes* to preserve its membrane fluidity despite the low temperature and thus to grow faster than the control. Similarly, it was hypothesized that the incorporation of environmental FA into the membrane of *L. casei* favors bacterial growth by optimizing membrane fluidity while saving energy (Tan et al., 2012). Due to their high melting temperature, exogenous SFA increase the WAMT of the membrane FA when incorporated. Despite the energy saving of FA synthesis, the higher WAMT of the membrane leads to a more rigid membrane which prevents an optimal exchange of metabolites and thus decreases the growth rate. The mechanisms of FA incorporation in the membrane phospholipids of *L. monocytogenes* should be explored. In Gram-positive bacteria, exogenous FA are bound by the FA binding protein, FakB, phosphorylated by the FA kinase, FakA, and the resulting acyl-phosphate is converted into acyl-ACP by an acyltransferase PlsX (Yao and Rock, 2017). Further investigation at genomic and transcriptomic levels is needed to understand why EGD-e have lower rates of incorporation of UFA which are concomitant with lower growth increase compared to Lm208, and to decipher the whole mechanisms of FA incorporation in *L. monocytogenes* at a molecular level.

## 5. Conclusion

In this study, we show that various FA are highly incorporated by the membrane of *L. monocytogenes* at low temperature, probably because this is a way to save energy used in FA synthesis. Nevertheless, UFA and SFA incorporations have opposite effects on *L. monocytogenes* growth at low temperature. UFA supplementation induces a decrease in phospholipid melting point temperature and promotes growth of the pathogen. In contrast, SFA supplementation inhibits bacterial growth. These behaviors could have fundamental consequences in terms of food safety and shelf-life

definition. In lipid-rich food products, where the distribution of FA is not homogeneous, the composition of the microenvironment immediately surrounding the bacteria should be considered to predict pathogen growth. More generally, models of predictive microbiology should consider the heterogeneity of bacterial behavior in relationship to food composition heterogeneity.

## 6. Acknowledgments

The authors thank L. Cheutin for preliminary experiments and P. Velge for providing the strain CNL 895805.

## 7. References

- Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., Prieto, M., 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 99–109. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.06.004>
- Ando, S., Nakajima, K., Hatano, M., 1992. Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into phospholipids of a marine bacterium *Vibrio* sp. cultivated with sardine oil. *J. Ferment. Bioeng.* 73, 169–171. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90709-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90709-4)
- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J., 1997. Critical role of anteiso-C(15:0) fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3887–3894. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3887-3894.1997>
- Augustin, J.C., Bergis, H., Midelet-Bourdin, G., Cornu, M., Couvert, O., Denis, C., Huchet, V., Lemonnier, S., Pinon, A., Vialette, M., Zuliani, V., Stahl, V., 2011. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. *Food Microbiol.* 28, 746–754. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.05.028>
- Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A., Mastronicolis, S.K., 2011. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 275–280. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02995.x>
- Booth, I.R., 2002. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00239-8)
- Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., Poyart, C., 2010. Brinster et al. reply. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08668>
- Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., Poyart, C., 2009. Type II fatty acid

- synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature* 458, 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature07772>
- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A., Coleman, H.P., Robins, M.M., 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 609–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03106.x>
- de Levie, R., 2012. *Advanced Excel for Scientific Data Analysis*, 3rd Edn. ed. Brunswick, Maine: Atlantic Academic.
- de Sarrau, B., Clavel, T., Zwickel, N., Despres, J., Dupont, S., Beney, L., Tourdot-Maréchal, R., Nguyen-the, C., 2013. Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiol.* 36, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.008>
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T., 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods.* [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0)
- Desbois, A.P., Smith, V.J., 2010. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E., Briandet, R., 2016. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01673>
- EFSA, CDC, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- Flegler, A., Iswara, J., Mänz, A.T., Schocke, F.S., Faßbender, W.A., Hölzl, G., Lipski, A., 2022. Exogenous fatty acids affect membrane properties and cold adaptation of *Listeria monocytogenes*. *Sci. Rep.* 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05548-6>
- Guillier, L., Nazer, A.I., Dubois-Brissonnet, F., 2007. Growth response of *Salmonella Typhimurium* in the presence of natural and synthetic antimicrobials: Estimation of MICs from three different models. *J. Food Prot.* 70, 2243–2250. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.10.2243>
- Herndon, J.L., Peters, R.E., Hofer, R.N., Simmons, T.B., Symes, S.J., Giles, D.K., 2020. Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) promote changes in growth, phospholipid composition, membrane permeability and virulence phenotypes in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 20, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01988-0>
- Hingston, P., Chen, J., Allen, K., Hansen, L.T., Wang, S., 2017. Strand specific RNA-sequencing and membrane lipid profiling reveals growth phase-dependent cold stress response mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180123>
- Horn, S.S., Ruyter, B., Meuwissen, T.H.E., Hillestad, B., Sonesson, A.K., 2018. Genetic effects of fatty acid composition in muscle of Atlantic salmon. *Genet. Sel. Evol.* 50, 1–12.

<https://doi.org/10.1186/s12711-018-0394-x>

- INRA, Anses, 2013. Etude d'impacts des chartes d'engagements volontaires de progrès nutritionnel sur les volumes de nutriments mis sur le marché: étude actualisée Rapport OQALI.
- Julotok, M., Singh, A.K., Gatto, C., Wilkinson, B.J., 2010. Influence of Fatty Acid Precursors, Including Food Preservatives, on the Growth and Fatty Acid Composition of *Listeria monocytogenes* at 37 and 10°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1423–1432. <https://doi.org/10.1128/AEM.01592-09>
- Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J., Truant, J.P., 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2, 23–28.
- Kelsey, J.A., Bayles, K.W., Shafii, B., McGuire, M.A., 2006. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Lipids* 41, 951–961. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5048-z>
- Malakar, P.K., Brocklehurst, T.F., MacKie, A.R., Wilson, P.D.G., Zwietering, M.H., Van'T Riet, K., 2000. Microgradients in bacterial colonies: Use of fluorescence ratio imaging, a non-invasive technique. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00222-1)
- Mastronicolis, S.K., Arvanitis, N., Karaliota, A., Litos, C., Stavroulakis, G., Moustaka, H., Tsakirakis, A., Heropoulos, G., 2005. Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 22, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.002>
- Mastronicolis, S.K., Berberi, A., Diakogiannis, I., Petrova, E., Kiaki, I., Baltzi, T., Xenikakis, P., 2010. Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 98, 307–316. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9439-z>
- Mastronicolis, S.K., German, J.B., Megoulas, N., Petrou, E., Foka, P., Smith, G.M., 1998. Influence of cold shock on the fatty-acid composition of different lipid classes of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 15, 299–306. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0170>
- Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B., Leveau, J.Y., 1999. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J. Appl. Microbiol.* 86, 859–866.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 407–439. <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>
- Neunlist, M.R., Federighi, M., Laroche, M., Sohier, D., Delattre, G., Jacquet, C., Chihib, N.E., 2005. Cellular lipid fatty acid pattern heterogeneity between reference and recent food isolates of *Listeria monocytogenes* as a response to cold stress. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 88, 199–206. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-5412-7>

- Palmer, D.N., Husbands, D.R., Jolly, R.D., 1985. Phospholipid fatty acids in brains of normal sheep and sheep with ceroid-lipofuscinosis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 834, 159–163. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90151-1)
- Parsons, J.B., Rock, C.O., 2013. Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* 52, 249–276. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
- Pernin, A., Dubois-Brissonnet, F., Roux, S., Masson, M., Bosc, V., Maillard, M.N., 2018. Phenolic compounds can delay the oxidation of polyunsaturated fatty acids and the growth of *Listeria monocytogenes*: structure-activity relationships. *J. Sci. Food Agric.* 98, 5401–5408. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9082>
- Püttmann, M., Ade, N., Hof, H., 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria* spp. on growth temperature. *Res. Microbiol.* 144, 279–283. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90012-Q](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90012-Q)
- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P.S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Takkinen, J., Wagner, M., Arcella, D., Da Silva Felicio, M.T., Georgiadis, M., Messens, W., Lindqvist, R., 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>
- Rogiers, G., Kebede, B.T., Van Loey, A., Michiels, C.W., 2017. Membrane fatty acid composition as a determinant of *Listeria monocytogenes* sensitivity to trans-cinnamaldehyde. *Res. Microbiol.* 168, 536–546. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.001>
- Seel, W., Flegler, A., Zunabovic-Pichler, M., Lipski, A., 2018. Increased isoprenoid quinone concentration modulates membrane fluidity in *Listeria monocytogenes* at low growth temperatures. *J. Bacteriol.* 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00148-18>
- Tan, W.S., Budinich, M.F., Ward, R., Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2012. Optimal growth of *Lactobacillus casei* in a Cheddar cheese ripening model system requires exogenous fatty acids. *J. Dairy Sci.* 95, 1680–1689. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4847>
- Tasara, T., Stephan, R., 2006. Cold Stress Tolerance of *Listeria monocytogenes*: A Review of Molecular Adaptive Mechanisms and Food Safety Implications. *J. Food Prot.* 69, 1473–1484.
- Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., Van der Merwe, M.J., Rautenbach, M., 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5223–5230. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5223-5230.2002>
- Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P., Velge, P., 1998. Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J. Appl. Microbiol.* 85, 337–346. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00515.x>
- Verheyen, D., Bolívar, A., Pérez-Rodríguez, F., Baka, M., Skåra, T., Van Impe, J.F., 2018. Effect of food microstructure on growth dynamics of *Listeria monocytogenes* in fish-based model systems. *Int. J. Food Microbiol.* 283, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.032>



- Yao, J., Rock, C.O., 2017. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.015>
- Zambiasi, R.C., Przybylski, R., Weber Zambiasi, M., Barbosa Mendonça, C., 2007. Fatty Acid Composition of Vegetable Oils and Fats. *Bol. do Cent. Pesqui. Process. Aliment.* 25, 111–120.

# Annexe 2 – Poster, congrès IsekiFood 2023

## Unraveling the role of oleic acid in *Listeria monocytogenes* cold adaptation by transcriptomic analysis

Aurore QUILLERE<sup>1</sup>, Maud DARSONVAL<sup>1</sup>, Angelos PAPADOCHRISTOPOULOS<sup>1</sup>, Pierre NICOLAS<sup>2</sup>, Florence DUBOIS-BRISSENET<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France  
<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350, Jouy-en-Josas, France

### Context & Objectives

Being a ubiquitous and psychrophilic foodborne pathogen, *Listeria monocytogenes* is responsible for listeriosis that causes a real public health issue and a challenge for the food industry especially for ready-to-eat products which allow *L. monocytogenes*' growth (Regulation EU 2073/2005 category 1.3). Refrigeration is the main measure to preserve food safety. However, *L. monocytogenes* is able to grow at low temperature by changing its membrane fatty acid composition. Recently, we have shown that *L. monocytogenes* grows faster at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids (eUFA) are present in its environment and incorporated into the membrane<sup>1</sup>. No significant differences were observed at 37°C<sup>1</sup>. The objective of this study is to decipher the molecular mechanism of oleic acid incorporation by *L. monocytogenes* at low temperature.

### Materials & Methods

*L. monocytogenes* CNL895805 was grown with or without oleic acid (C18:1) supplementation at 5°C and 37°C. Total RNA was extracted by Trizol™ reagent method and sequenced by Illumina (I2BC platform). Differential gene expression analysis of the 4 pairwise comparisons was performed using the DeSeq2-Rpackage. Flagellar structure was observed in Transmission Electron Microscopy (TEM) and mobility tracking of single cell by Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM).

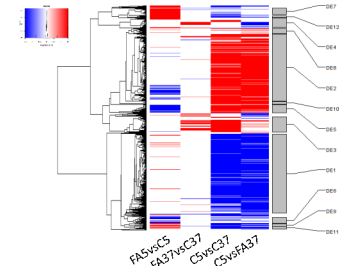


### Results

- 1164 genes are differentially expressed among all comparisons (threshold log<sub>2</sub>FC ≥ 1 in red and ≤ -1 in blue)
- Comparison FA5.vs.C5 : 94 genes up-regulated 88 genes down-regulated

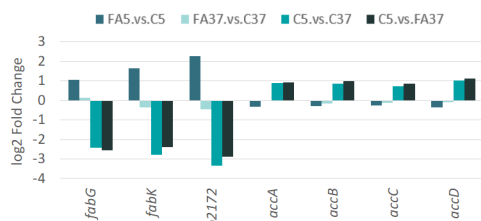
The hierarchical clustering tree was used to define 12 Differential Expression (DE) clusters. In each DE, the percentage of Gene Ontology was calculated. Gene Ontology with the most differentially expressed genes were inorganic ion transport and metabolism, chemotaxis and cell motility, fatty acid (FA) and amino acid (AA) biosynthesis and plasma membrane proteins and transport proteins.

Heatmap representation of the relative variations of expression level across comparison for differentially expressed genes



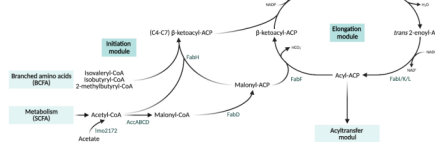
### Expression of genes related to FA metabolism

Log<sub>2</sub>-Fold Change values for 4 pairwise comparisons for 7 genes involved in FASII



- *fabG*, *fabK* and *lmo2172* (propionate CoA transferase): FA5.vs.C5 up-regulated  
→ Exogenous C18:1 could be up-taken into the FASII elongation module to be incorporated into the membrane

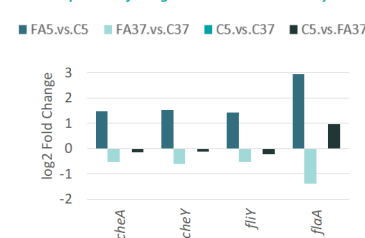
### FASII biosynthesis



- *acc* genes (initiation module of fatty acid synthesis): C5.vs.C37 up-regulated, FA5.vs.C5 slightly down-regulated  
→ As previously observed in *S. aureus*, exogenous C18:1 seems to repress the expression of AccABCD complex<sup>2</sup>

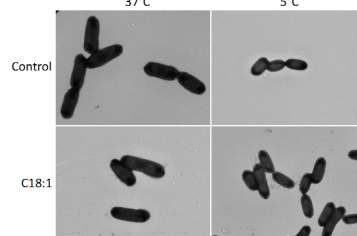
### Expression of genes related to motility

Log<sub>2</sub>-Fold Change values for 4 pairwise comparisons for 4 genes involved in mobility

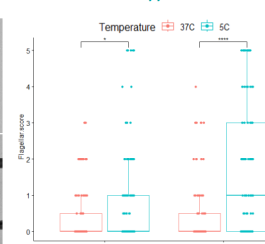


- Chemotaxis and flagellar assembly genes: FA5.vs.C5 up-regulated but not FA37.vs.C37

*L. monocytogenes* at 5°C and 37°C with or without C18:1 supplementation (TEM)



Flagellar length at 5°C and 37°C with or without C18:1 supplementation



- In TEM: significantly more bacteria with flagella and longer flagella at 5°C with oleic acid
- Mobility tracking of single cell using CSLM: no significant difference in any conditions  
→ Exogenous C18:1 impact the flagellar structure but not the motility

### Conclusion

Several *Listeria monocytogenes* genes involved in the mechanism of exogenous C18:1 incorporation at low temperature were identified by transcriptomic analysis. The expression of these genes will be explored by RT-qPCR with other saturated and unsaturated fatty acids to understand the behavior of *Listeria monocytogenes* at low temperature. Moreover, these genes will be targeted by KO mutation to describe the molecular mechanism of FA uptake.

# Annexe 3 – Version soumise de l'article n°1 *genome announcement*

---



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY



**Microbiology**  
Resource Announcements

## High-quality genome assembly of *Listeria monocytogenes* Lm208 (CNL895805): a wild-type strain able to grow faster in the presence of exogenous unsaturated fatty acids at low temperature

Maud DARSONVAL<sup>a#</sup>, Hélène GARDON<sup>b</sup>, Aurore QUILLERE<sup>a</sup>, Philippe VELGE<sup>c</sup>,  
Laurent GUILLIER<sup>d</sup>, Florence DUBOIS-BRISSONNET<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

<sup>b</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SAYFOOD, 91120 Palaiseau, France

<sup>c</sup>INRAE, Université de Tours, ISP, 37380 Nouzilly, France

<sup>d</sup>Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), Direction de l'évaluation des risques, 94700 Maisons-Alfort, France

### Corresponding author's email address

#Address correspondence to Maud Darsonval, [maud.darsonval@agroparistech.fr](mailto:maud.darsonval@agroparistech.fr)

### Running title

Comprehensive Genome Analysis of *Listeria monocytogenes* Lm208

with Focus on Fatty-Acid Metabolism Genes

## 1. Abstract

The genome of a wild-type *Listeria monocytogenes* strain, Lm208, has been sequenced and assembled. The draft genome has been automatically annotated. Considering its specific ability to grow faster at low temperature in the presence of exogenous unsaturated fatty acids, the annotation of genes related to fatty-acid metabolism has been deepened.

## 2. Announcement

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen responsible for listeriosis. Lmo208 (CNL895805, serotype 1/2a) isolated in 1992 from a sheep's brain, can grow faster at low temperature in the presence of exogenous unsaturated fatty acids (FA) (1, 2). Genomic DNA was extracted and purified from 16h-culture in TSB using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, France). DNA sequencing was performed at the "Institut du Cerveau et de la Moëlle" (Paris, France). After quantification, DNA-seq libraries were prepared with Nextera® XT DNA Flex Library kit (Illumina, San Diego, USA). DNA-seq was performed on NextSeq 500 system using a paired-end read length of 2x150 bp with the Illumina High Output kits. Raw reads (1,217,365 sequences, 151 bp) were analyzed using tools of the Galaxy portal (<https://galaxy.migale.inrae.fr/>). Trimming was performed with parameters set as followed: Initial IlluminaClip, leading 3, Trailing 3, Sliding Window 4-20 and Minlen 125 bp (Trimmomatic v39.0) (3). The quality of 421,351 trimmed reads was checked with fastQC (v0.11.9) (4). *De novo* assembly was performed using SPAdes (v3.15.4) and followed by quality control (Quast v5.2.0) (5, 6). After ordering by progressiveMauve (2015-02-26) (7), the size of the genome was 2,871,758 bp made of 12 contigs with a GC content of 37.9%, N50 value of 1,458,283 bp, L50 of 1, and an average coverage of 128X. Automatic annotation was performed with Prokka (v1.14.6) using the proteome of *L. monocytogenes* EGD-e as reference (UP000000817) (8).

2,824 predicted protein-coding genes were detected with 49 tRNAs and 4 rRNAs. 2,686 CDS were assigned to a gene name (GN) according to the locus tag of *L.*

*monocytogenes* EGD-e. Fifty CDS were identified using *ListWiki*, *ListeriOmics*, or NCBI's database (9, 10). After enrichment, 120 CDS remains as hypothetical proteins. Lm208 does not harbor antibiotic resistance genes nor plasmids (Staramr v0.7.2.1) (11). Two phage regions were identified with PHASTEST (<https://phastest.ca/>): the *Listeria* phage A118 (NC\_003216) prophage in the *comK* integration site and a partial *Streptococcus* phage T12 (NC\_028700) interrupting the locus *lmo208\_02875* (12 – 14). Contigs No. 3, 13 and 15 displayed repeated consensus regions of CRISPR and their associated caspase proteins (CRISPRCasFinder; <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>) (15). Clonal complex (CC) and lineage were defined *in silico* using the BIGSdb database (<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria>) revealed that Lm208 belongs to lineage II and CC7, a CC gathering strains rarely isolated from food (16). Lm208 highlights high similarity with the four reference strains with a maximum of average nucleotide identity (ANI) at 99.99% with *L. monocytogenes* 10403S and a minimum of ANI at 94.94% with *L. monocytogenes* ScottA (FastANI (v1.3) (Table 1, 18). The annotation of Fak and Fab proteins, involved in the FA incorporation and the FASII system was investigated (1). One FakA protein and two FakB were identified by BLASTp using the well-described *Staphylococcus aureus* FakAB system as query sequences (18, 19). Eleven Fab proteins were found by Prokka or by NCBI's BLASTp database and multiple sequence alignment (ClustalOmega v1.2.4) with 114 Fab sequences from *Streptococcaceae* and *Bacillaceae* (20). Phenotypic investigation is needed to identify the genetic marker related to its specific ability to grow faster in the presence of unsaturated FA.

### 3. Data availability

This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number (submitted on July, 18<sup>th</sup>) and in the NCBI Sequence Read Archive (SRR SRR29855365) under BioProject accession number PRJNA1074122 and BioSample number SAMN39851069, respectively.

## 4. Acknowledgments

This work benefited from equipment and services from the iGenSeq core facility (Genotyping and sequencing), at ICM.

## 5. Legends

**Table 1:** Genome metrics of *L. monocytogenes* Lm208 and comparison to domestic reference strains EGD-e, EGD, ScottA, LO258 and 10403S (cf. Résultats Expérimentaux – Partie 1, Article 1).

## 6. References

1. Touche C, Hamchaoui S, Quilleré A, Darsonval M, Dubois-Brissonnet F. 2023. Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane. *Food Microbiol* 110:104170.
2. Tabouret M, De Rycke J, Dubray G. 1992. Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. *J Gen Microbiol* 138:743–753.
3. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120.
4. Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
5. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
6. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A V., Sirotkin A V., Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477.
7. Darling AE, Mau B, Perna NT. 2010. Progressivemauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5.
8. Seemann T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069.
9. Elfmann C, Zhu B, Stülke J, Halbedel S. 2023. ListiWiki: A database for the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Int J Med Microbiol* 313.
10. Bécavin C, Koutero M, Tchitchek N, Cerutti F, Lechat P, Maillet N, Hoede C, Chiapello H, Gaspin C, Cossart P. 2017. Listeriomics: an Interactive Web Platform for Systems Biology of *Listeria*. *mSystems* 2:1–15.
11. Bharat A, Petkau A, Avery BP, Chen J, Folster J, Carson CA, Kearney A, Nadon C, Mabon P,

- Thiessen J, Alexander DC, Allen V, El Bailey S, Bekal S, German GJ, Haldane D, Hoang L, Chui L, Minion J, Zahariadis G, Van Domselaar G, Reid-Smith RJ, Mulvey MR. 2022. Correlation between Phenotypic and In Silico Detection of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* in Canada Using Staramr. *Microorganisms* 10:1–10.
12. Bécavin C, Bouchier C, Lechat P, Archambaud C, Creno S, Gouin E, Wu Z, Kühbacher A, Brisse S, Pucciarelli MG, García Del Portillo F, Hain T, Portnoy DA, Chakraborty T, Lecuit M, Pizarro-Cerda J, Moszer I, Bierne H, Cossart P. 2014. Comparison of Widely Used *Listeria monocytogenes* Strains EGD, 10403S, and EGD-e Highlights Genomic Differences Underlying Variations in Pathogenicity. *MBio* 5:1–12.
  13. Wishart DS, Han S, Saha S, Oler E, Peters H, Grant JR, Stothard P, Gautam V. 2023. PHASTEST: Faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res* 51:W443–W450.
  14. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44:W16–W21.
  15. Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B, Rocha EPC, Vergnaud G, Gautheret D, Pourcel C. 2018. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res* 46:W246–W251.
  16. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha EPC, Brisse S, Lecuit M. 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 48:308–313.
  17. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9:1–8.
  18. Parsons JB, Broussard TC, Bose JL, Rosch JW, Jackson P, Subramanian C. 2014. Identification of a two-component fatty acid kinase responsible for host fatty acid incorporation by *Staphylococcus aureus* 1–6.
  19. Cuypers MG, Subramanian XC, Gullett JM, Frank MW, White SW, Rock XCO. 2019. Acyl-chain selectivity and physiological roles of *Staphylococcus aureus* fatty acid – binding proteins. *J Biol Chem* 294:38–49.
  20. Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, Eusebi A, Niewielska A, Tivey ARN, Lopez R, Butcher S. 2024. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res* 52:1–525.

# Annexe 4 – Script R : analyse de l'expression différentielle des gènes

---

```
#####HEADER#####
#####Aurore QUILLERE
#####Analyse différentielle de l'expression des genes
#####Total : 6 comparaisons deux a deux

#####Installation des packages#####
#install.packages("fdrtool")

#install.packages("BiocManager")

#BiocManager::install("DESeq2")
#BiocManager::install(c("GenomicRanges", "XVector"))
#BiocManager::install("GenomicRanges", force = TRUE)
#BiocManager::install("Biostrings")

#####Importation des fichiers#####
tmat <- read.table("Counts_20220121.csv"),
              sep = "\t",
              header = TRUE,
              stringsAsFactors = FALSE)

#####Visualisation des donnees#####
dim(tmat)
tmat[1:5,]
summary(tmat)

#####Creation d'un nouveau vecteur#####
tmat.rawcounts <- tmat[,substr(colnames(tmat),1,6)=="Counts"]
tmat.rawcounts[1:5,]

#####Creation d'une nouvelle matrice et d'un nouveau data.frame#####
tt <- matrix(unlist(strsplit(colnames(tmat.rawcounts),
                          split=".",
                          fixed=TRUE)),
            ncol=3,
            byrow=TRUE)

tsampldesc <- as.data.frame(list("condition"=tt[,2]),stringsAsFactors=F)
tsampldesc$replicateid <- paste0("R",tt[,3])
tsampldesc$sampleid <- paste0(tsampldesc$condition,".",tsampldesc$replicateid)
colnames(tmat.rawcounts) <- paste0(tsampldesc$sampleid,".rawcount")

#####DESeq normalisation#####
library(DESeq2)

tdesignvanilla <- as.data.frame(list("vanilla"=paste
                                ("Vanilla",rep(1:(ncol(tmat.rawcounts)/3),
                                each=3),
                                sep=""))))

dds.all <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = tmat.rawcounts,
                                colData = tdesignvanilla,
                                design = ~ vanilla - 1)

colSums(tmat.rawcounts)
min.count.gn=10
min.exp.gn=3
ikeep.gn <- (rowSums(counts(dds.all) >= min.count.gn) >=min.exp.gn)
sum(ikeep.gn)

###Estimation des facteurs de normalisation
```



```

dds.all <- estimateSizeFactors(dds.all,controlGenes=which(ikeep.gn))
sizeFactors(dds.all)

###Stockage des facteurs de normalisation
dds <- dds.all[ikeep.gn,]
sf <- sizeFactors(dds)
sf
tsampldesc$sizeFactorsDESeq2 <- sf

###Calcul des FPKM
mcols(dds.all)$basepairs <- tdat$Length.bp
tfpkm <- fpkm(dds.all)
tfpkm[1:10,]
apply(tfpkm,MARGIN=2,FUN=median)
tfpkm.log2 <- log2(tfpkm+5)
colnames(tfpkm.log2) <- paste0(tsampldesc$sampleid, ".log2fpkm")

#####Représentation graphique#####
tcor <- cor(tfpkm.log2)
tdist <- as.dist(1-tcor)
thclust <- hclust(tdist,method="average")

pdf("D1.CAH.Replicats_20220812.pdf"),width=7,height=7)
plot(thclust,
     hang = -1,
     ylab = "1-r", xlab = "",
     sub = "",
     main = "Average-link clustering (log2 fpkm)",
     labels=tsampldesc$sampleid)

pdf("D1.Dotplot.FA5R2vsFA5R3_20220812.pdf"),width=7,height=7)
plot(tfpkm.log2[,8],tfpkm.log2[,9])
abline(a = 0, b = 1)
abline(a = -1, b = 1,lty = 3)
abline(a = 1, b = 1,lty = 3)

#####Identification des DEG#####
trelevantcomp <- list()
trelevantcomp[[1]]<- c("FA5","C5")
trelevantcomp[[2]]<- c("FA37","C37")
trelevantcomp[[3]] <- c("C5","C37")
trelevantcomp[[4]]<- c("C5","FA37")
trelevantcomp[[5]]<- c("FA5","C37")
trelevantcomp[[6]] <- c("FA5","FA37")

tlistcond <- unique(tsampldesc$condition)
tmeanbycond <- list()

for (tcond in tlistcond) {
  jj=which(tsampldesc$condition==tcond)
  meanbycond[[paste0(tcond, ".meanlog2fpkm")] ]
    =apply(tfpkm.log2[,jj],FUN=mean,MARGIN=1)
}

tmeanbycond <- as.data.frame(tmeanbycond,stringsAsFactors=F)
tmeanbycond[1,]

library("graphics")

pdf("D1.Scatterplot_20220812.pdf"),width=12,height=12)
par(mfrow=c(2,3))
par(mar=c(4,4,1,1))
xlim=range(tmeanbycond)
for (icomp in 1:length(trelevantcomp)) {
  tcy <- paste0(trelevantcomp[[icomp]][1], ".meanlog2fpkm")
  tcx <- paste0(trelevantcomp[[icomp]][2], ".meanlog2fpkm")
  plot(tmeanbycond[[tcx]],tmeanbycond[[tcy]],
       xlab=tcx,ylab=tcy,xlim=xlim,ylim=ylim,cex=0.7)
}

```

```

grid()
abline(a=0,b=1,col="red",lwd=2)
abline(a=1,b=1,col="red",lty=2,lwd=2)
abline(a=-1,b=1,col="red",lty=2,lwd=2)
}

####Analyse differentielle####
dds <- DESeq(dds)
tcontrast.mat <- matrix(0,ncol=length(tlistcond),nrow=length(trelevantcomp))
tcomp.code.vec <- c()

for (icomp in 1:length(trelevantcomp)) {
  icx <- which(tlistcond==trelevantcomp[[icomp]][2])
  icy <- which(tlistcond==trelevantcomp[[icomp]][1])
  tcontrast.mat[icomp,icx] <- -1
  tcontrast.mat[icomp,icy] <- 1
  tcomp.code.vec <- c(tcomp.code.vec,paste0(trelevantcomp[[icomp]][1],
      '.vs.',trelevantcomp[[icomp]][2]))
}

tcontrast.mat
tcomp.code.vec

library(fdrtool)

tres.summary <- cbind(tdat[, (1:3)],tmat.rawcounts,
      round(tfpkm.log2,4),round(tmeanbycond,4))
tres.summary[1:5,]

for (icomp in 1:length(tcomp.code.vec)) {
  tres=results(dds,contrast=tcontrast.mat[icomp,], cooksCutoff=FALSE)
  tcomp.code=tcomp.code.vec[icomp]
  tlog2FC=tres$log2FoldChange
  tpvals=tres$pvalue
  tqval=fdrtool(tpvals,statistic="pvalue")$qval
  tres.summary[[paste(tcomp.code, ".log2FC", sep="")]][ikeep.gn]=signif(tlog2FC,3)
  tres.summary[[paste(tcomp.code, ".qval", sep="")]][ikeep.gn]=signif(tqval,3)
  tcode=rep("~",times=sum(ikeep.gn))
  tcode[tlog2FC >= log2(1.5) & tqval <= 0.05]="u"
  tcode[tlog2FC >= 1 & tqval <= 0.05]="U"
  tcode[tlog2FC <= -log2(1.5) & tqval <= 0.05]="d"
  tcode[tlog2FC <= -1 & tqval <= 0.05]="D"
  tres.summary[[paste(tcomp.code, ".code", sep="")]][ikeep.gn]=tcode
}

####Exportation des donnees####
write.table(tres.summary,"D1-Summary.AnalyseDE.CONDSUP_20220812.csv"),
      sep="\t",
      row.names=F,
      quote=F)

write.table(tsampledesc,"D1-SampleDescription.AnalyseDE.CONDSUP_20220812.csv"),
      sep="\t",
      row.names=F,
      quote=F)

#####END#####

```

# Annexe 5 – Script R : visualisation des données de RNA-seq

```
#####HEADER#####
#####Aurore QUILLERE
#####Représentations graphiques de l'analyse différentielle
#####Avec seulement les genes différentiellement exprimés

#####Installation des packages#####
#install.packages("gplots")

#####Importation des fichiers#####
tlistsamples <-
read.table("SampleDescription.AnalyseDE.OrdreReplicats_20220812.csv"),
header = TRUE,
sep=";",
stringsAsFactors = FALSE)

tres.summary <- read.table("D1-Summary.AnalyseDE.CONDSUP_20220812.csv"),
header = TRUE,
sep="\t",
stringsAsFactors = FALSE)

#####Visualisation des données#####
summary(tlistsamples)
tlistsamples[1:5,]
str(tlistsamples)

summary(tres.summary)
tres.summary[1:5,]
str(tres.summary)

#####Creation du dataframe#####
tcompname <- c("FA5.vs.C5",
"FA37.vs.C37",
"C5.vs.C37",
"C5.vs.FA37",
"FA5.vs.C37",
"FA5.vs.FA37")

iselcol.DE <- match(paste0(tcompname, '.code'), colnames(tres.summary))
tcountsDE <- list("compname"=tcompname)

for (tlab in c("D","d","~","u","U")) {
tcountsDE[[tlab]] <- apply(tres.summary[,iselcol.DE]==tlab,
MARGIN=2, FUN=sum, na.rm=TRUE)
}

tcountsDE <- as.data.frame(tcountsDE, stringsAsFactors = FALSE)

#####Importation de la palette de couleurs#####
source("heatmap_colors.R")

tmycolor.heatmap <- tmycolor.heatmap.bluewhitered
tmycol <- tmycolor.heatmap[seq(1,length(tmycolor.heatmap),length.out=5)]

#####Realisation du barplot#####

pdf("D3.Barplot.GenesCounts_20220812.pdf"), width=8,height=4)
par(mar=c(7,5,1,1))
txpos <- barplot(t(as.matrix(tcountsDE[,2:6])),
las = 2,
names.arg = tcompname,
```

```

ylab = "#genes",
col = tmycol,
ylim = c(0, ceiling(nrow(tres.summary)/500)*500),
cex.names = 0.6)
text(txpos-0.1, 0.85*nrow(tres.summary)/2,
tcountsDE$D, col=tmycol[1], srt=90, cex=1)
text(txpos-0.1, 1.15*nrow(tres.summary)/2,
tcountsDE$U, col=tmycol[5], srt=90, cex=1)
text(txpos+0.1, 0.85*nrow(tres.summary)/2,
tcountsDE$d, col=tmycol[2], srt=90, cex=1)
text(txpos+0.1, 1.15*nrow(tres.summary)/2,
tcountsDE$u, col=tmycol[4], srt=90, cex=1)

####Realisation de l'arbre####
###Sans identification des clusters
iselgns <- which(apply(tres.summary[, iselcol.DE]=="U", na.rm=T, FUN=sum, MARGIN=1)
+apply(tres.summary[, iselcol.DE]=="D", na.rm=T, FUN=sum, MARGIN=1)>0)

tmat <- as.matrix(tres.summary[iselgns, match(paste0(tlistsamples$sampleid,
'.log2fpkm'), colnames(tres.summary))])

tmat.centered <- t(scale(t(tmat), center=T, scale=F))

range(tmat)
range(tmat.centered)

pdf("D3.Hist.tmat_20220812.pdf", width=8, height=4)
hist(tmat)

pdf("D3.Hist.tmatcentered_20220812.pdf", width=8, height=4)
hist(tmat.centered)

tmat.centered.trunc=tmat.centered
tmat.centered.trunc[tmat.centered>2]=2
tmat.centered.trunc[tmat.centered<-2]=2

pdf("D3.Hist.tmatcenteredtrunc_20220812.pdf", width=8, height=4)
hist(tmat.centered.trunc)

tcor.gn <- cor(t(tmat))
tdist.gn <- as.dist(1-tcor.gn)
thclust.cor.gn <- hclust(tdist.gn, method="average")

pdf("D3.Plot.hclust_20220812.pdf", width=8, height=4)
plot(thclust.cor.gn)

###Avec identification des clusters
xorder.hcl.cor.gn <- (1:nrow(tmat))
xorder.hcl.cor.gn[thclust.cor.gn$order] <- (1:nrow(tmat))

renameclustbysize <- function(tii, tpref) {
stii=sort(table(tii), decreasing=T)
toldnames=names(sort(table(tii), decreasing=T))
tnewnames=paste(tpref, as.character(1:length(stii)), sep="")
newtii=as.character(tii)
for (i in 1:length(stii)) {
newtii[tii==toldnames[i]]=tnewnames[i]
}
return(newtii)
}
iclust.hcl.cor.gn <- renameclustbysize(cutree(thclust.cor.gn, h=0.3), "DE")
tres.summary$xorder.hcl.cor.gn=NA
tres.summary$xorder.hcl.cor.gn[iselgns]=xorder.hcl.cor.gn
tres.summary$iclust.hcl.cor.gn=NA
tres.summary$iclust.hcl.cor.gn[iselgns]=iclust.hcl.cor.gn

pdf("D3.hclust_20220812.pdf", width=8, height=4)
plot(as.dendrogram(thclust.cor.gn),

```

```

leaflab = "none",
ylim = c(-1,2),
sub = "",
main = "gene correlation tree",
xlab = paste(length(iselgns),"genes"),
ylab = "1-r",
axes = FALSE)
axis(2,at=seq(0,2,by=0.5))
abline(h=0.3)

pdf("D3.hclust.withclustnames_20220812.pdf"),width=8,height=4)
plot(as.dendrogram(thclust.cor.gn),
leaflab = "none",
ylim = c(-1,2),
sub = "",
main = "gene correlation tree",
xlab = paste(length(iselgns),"genes"),
ylab = "1-r",
axes = FALSE)
axis(2,at=seq(0,2,by=0.5))
abline(h=0.3)
trle <- rle(iclust.hcl.cor.gn[thclust.cor.gn$order])
iselclust <- which(trle$lengths>=10)
tmat.igns.clust.range <- matrix(0,ncol=2,nrow=length(iselclust))
tcol.clust <- rep("gray",times=length(iselclust))
for (i in 1:length(iselclust)) {
iclust=iselclust[i]
tclustlab=trle$values[iclust]
igns.clust.range=range(xorder.hcl.cor.gn[iclust.hcl.cor.gn==tclustlab])
tmat.igns.clust.range[i,]=igns.clust.range
texp=0.5
tcol.fill="white"
if (trle$lengths[iclust]>=40) { #0.05*length(iselgns)) {
tcol.clust[i]="black"
tcol.fill="gray"
texp=1
}
polygon(rep(igns.clust.range,each=2),-0.15+0.1*c(-1,1,1,-
1)*texp,col=tcol.fill,border="black")
#if (texp>0.75)
{mtext(tclustlab,side=1,at=mean(igns.clust.range),line=0,col=tcol,cex=0.5,las=3)}
}
n=nrow(tmat.igns.clust.range)
xx0=rowMeans(tmat.igns.clust.range)
xx1=seq(1,length(iselgns),length.out=n)
#xx1=(1:n)*length(iselgns)/(n+1)
segments(x0=xx0,y0=-0.25,y1=-0.35,col=tcol.clust)
segments(x0=xx0,x1=xx1,y0=-0.35,y1=-0.7,col=tcol.clust)
segments(x0=xx1,y0=-0.7,y1=-0.8,col=tcol.clust)
text(xx1,rep(-0.82,times=nrow(tmat.igns.clust.range)),
trle$values[iselclust],
srt=-90,
cex=0.7,
col=tcol.clust,
adj=c(0,0.5))

#####Realisation de la heat map#####
library(gplots)

###Pour chaque replicat
pdf("D3.Heatmap.Replicats.ORDRE_20220812.pdf"),width=6,height=11)
heatmap.2(tmat.centered.trunc,
scale="none",
Rowv=as.dendrogram(thclust.cor.gn),
Colv=NA,
labRow=NA,
labCol=tlistsamples$sampleid,
col=tmycolor.heatmap,

```

```

na.color="black",
density.info="density",
trace="none",
denscol="black",
key.title="scale",
key.xlab="log2 (fpkm+5) ",
dendrogram="row",
margins=c(16,2),
useRaster=T,
cexCol=1.2,
lwid=c(1,2))

###Pour chaque comparaison
tDE.mat=tres.summary[iseln,iselcol.DE]
tDE.mat.signif=matrix(0,ncol=ncol(tDE.mat),nrow=nrow(tDE.mat))
tDE.mat.signif[tDE.mat=="U"]=1.5
tDE.mat.signif[tDE.mat=="u"]=0.75
tDE.mat.signif[tDE.mat=="d"]=-0.75
tDE.mat.signif[tDE.mat=="D"]=-1.5
tDE.mat.signif[is.na(tDE.mat)]=NA

pdf("D2.Heatmap.AnalyseDE_20220812.pdf"),width=4,height=11)
heatmap.2(tDE.mat.signif,
scale="none",
Rowv=as.dendrogram(thclust.cor.gn),
Colv=NA,
labRow=NA,
labCol=tcompname,
col=tmycolor.heatmap,
na.color="black",
density.info="density",
trace="none",
denscol="black",
key.title="scale",
key.xlab="log2 (fpkm+5) ",
dendrogram="row",
margins=c(16,2),
useRaster=T,
cexCol=1.2,
lwid=c(1,2))

#####Exportation des fichiers#####
summary(tres.summary)
write.table(tres.summary,"D2.Summary.AnalyseDE.withDE.CONDSUP_20220812.csv"),
sep="\t",
row.names=F,
quote=F)

#####END#####

```