

Décontamination microbienne des surfaces : évaluation du potentiel de l'humidité relative sur la destruction et la physiologie de *Listeria monocytogenes*

Fiona Zoz – Doctorante

Directeur de thèse : Pr Laurent Beney

Dr Cosette Grandvalet

Dr Stéphane Guyot

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques



➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

➤ **Problématique**

➤ Approche expérimentale

➤ **Résultats et Discussion**

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ **Conclusions et perspectives**



- Bacille, gram +, environnement : sol, lacs, rivières, eaux d'égouts, végétation...
 - Environnements hostiles :
 - basse température
 - pH faible
 - forte concentration en sel
- Persiste dans les ateliers et équipements agro-alimentaires

➤ Contamination des aliments



➤ Listériose : gastro-entérite, septicémie, infection du système nerveux central (population sensible), avortement chez les femmes enceintes

➤ Epidémiologie :

- En France (2013) : 5,6 cas de listériose/millions d'habitants (InVS)
- USA (2009-2011) : 2,9 cas de listériose/millions d'habitants/an (CDC)
- Taux de mortalité de 20 à 30%



- Procédures de nettoyage et désinfection en industries agro-alimentaires :
 - détergents alcalins et acides
 - enzymes
 - désinfectants chimiques [1]

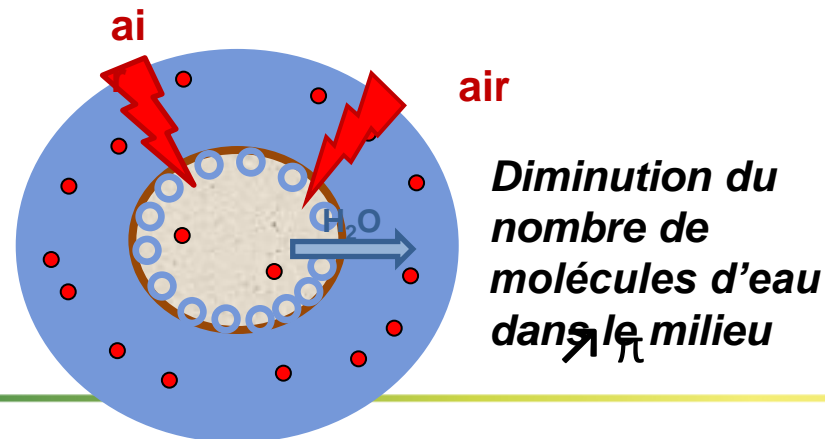
→ Nocif pour l'environnement

- Résistance des souches de *L. monocytogenes* [2][3] [4]
- Nombreux rappels de produits contaminés (FDA)

→ Impact sanitaire

➡ Méthode éco-responsable : Séchage ?

- Méthode de préservation (protectants, température, cinétique optimale)
- Peu testé pour contrôler les populations cellulaires
- *L. monocytogenes* résistante à la dessiccation : 91 jours à 43% HR sur de l'acier inoxydable à 15°C [6]
- Principaux effets du séchage sur la cellule :
 - **Contrainte mécanique** : perte d'eau de la cellule, diminution du volume cellulaire
 - **Contrainte structurale** : désorganisation de la bicouche lipidique, agrégation des molécules, modification structurale des protéines
 - **Stress oxydatif** : cellule en contact avec l'oxygène de l'air



Objectif :

Evaluer le potentiel de destruction
des fluctuations de l'humidité
relative sur *L. monocytogenes*

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

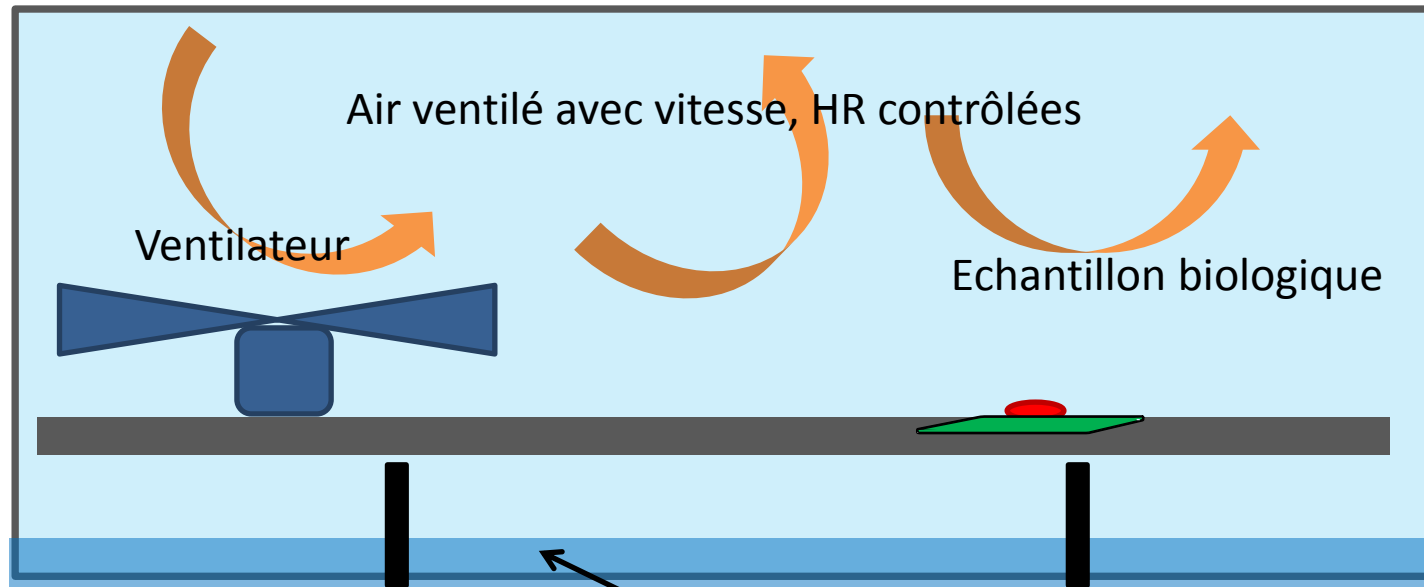
3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives



Solution saturée en sel avec a_w contrôlée : NaCl = 0,75; KI=0,68, K_2CO_3 = 0,43; LiCl = 0,11

➤ Criblage de 30 souches de *L. monocytogenes* à la déshydratation (différentes lignées, sérotypes, origines)



➤ Sélection de 4 souches de *L. monocytogenes* :

EGDe (sérotipe : 1/2a, origine : cas clinique animal)

CCL500 (sérotipe : 1/2b, origine : lait)

→ Résistantes à la déshydratation

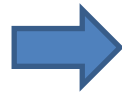
CCL128 (sérotipe : 4b, origine : industrie fromagère)

→ Modérément résistante à la déshydratation

LO28 (sérotipe : 1/2c, origine : cas clinique de listériose)

→ Sensible à la déshydratation

Culture de *L. monocytogenes* à 25°C et lavage dans du PBS



Dépôt de 10 µL de suspension bactériennes ($\approx 10^9$ UFC/mL) sur coupon de polypropylène

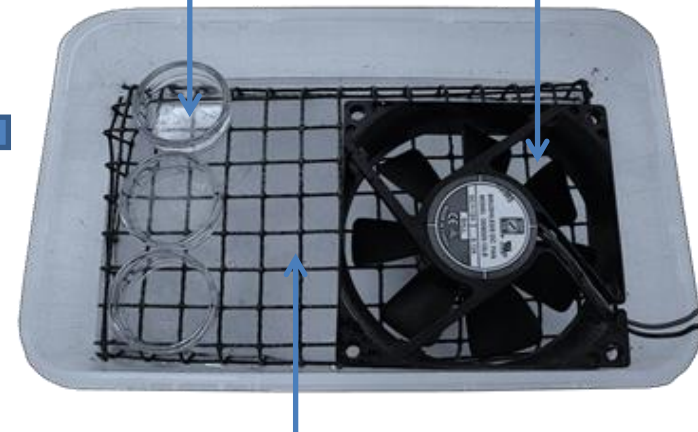


Pesée de l'échantillon avant et après séchage



Echantillon

Ventilateur



Réhydratation cellulaire dans 1 mL de PBS = réhydratation rapide



Mesure de la viabilité par la méthode UFC sur boîte gélosée

Solution saturée en sel : NaCl = 75% HR, KI = 68%, K₂CO₃ = 43% HR, LiCl = 11% HR
Incubation à 25°C

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

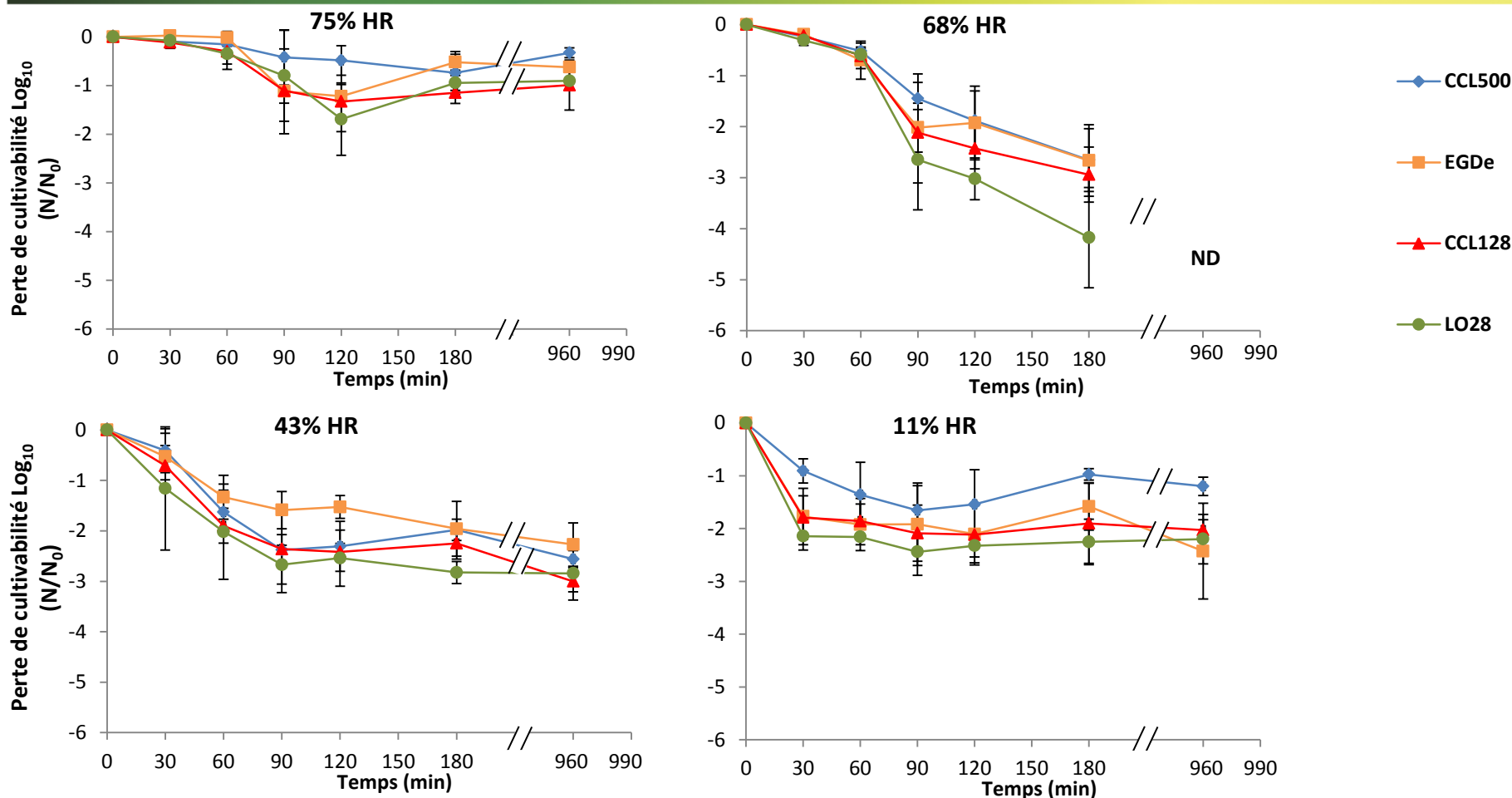
4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

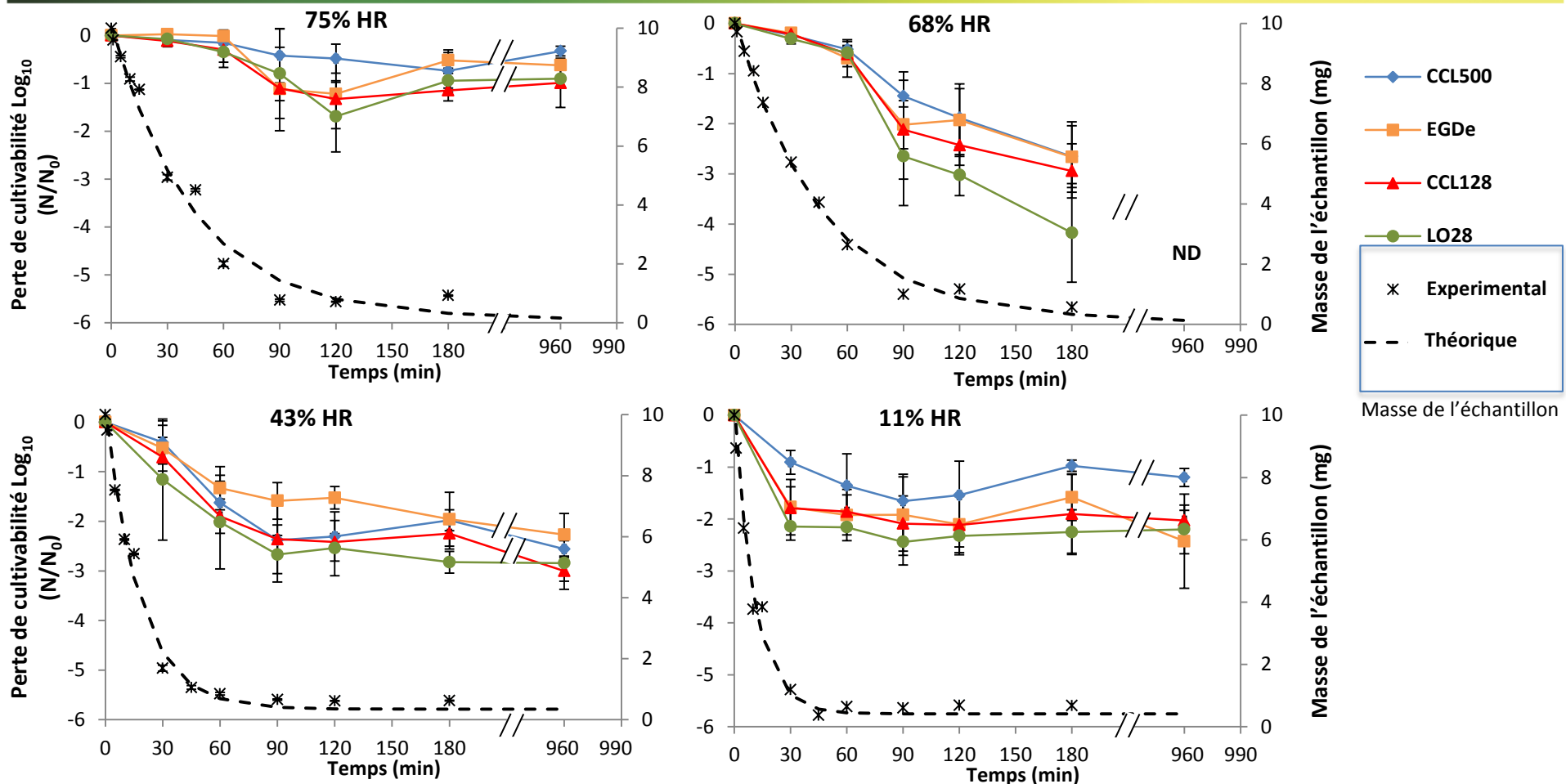
Influence de l'humidité relative sur la survie de *L. monocytogenes*



- Plus l'humidité relative est faible plus la perte de cultivabilité est rapide
- Entre 90min et 960min de séchage : la cultivabilité se stabilise (excepté 68% HR)
- Séchage à 68% HR : La mort cellulaire continue après l'étape transitoire de séchage

- Deux étapes sont observées : perte de cultivabilité et stabilisation de la cultivabilité
- Cultivabilité 75% HR > 11% HR > 43% HR > 68% HR

Influence de l'humidité relative sur la survie de *L. monocytogenes*



➤ Perte rapide de cultivabilité pendant l'évaporation de l'échantillon : plus la perte de masse est rapide, plus la perte de cultivabilité est rapide

➤ Entre 90min et 960 min de séchage : la cultivabilité se stabilise tout comme l'évaporation de l'échantillon (sauf 68% HR)
 → Influence de la vitesse d'évaporation de l'échantillon ?

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

Influence de la vitesse de déshydratation sur la survie de *L. monocytogenes*

		Perte de cultivabilité Log ₁₀ (N/N ₀) (SD)							
HR enceinte de séchage	Vmax (10 ⁻³ mg/min)	EGDe		CCL500		CCL128		LO28	
		180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min
43%	0,72	- 2,32 (± 0,40) ^{ab}	-3,74 (± 0,6) ^c	-2,59 (± 0,41) ^{abc}	-3,02 (± 0,28) ^{abc}	-2,77 (± 0,29) ^{ab}	-3,49 (± 0,24) ^b	-3,11 (± 0,17) ^a	-3,97 (± 0,26) ^a
	0,56	-1,95 (± 0,54) ^a	-2,27 (± 0,43) ^{ab}	-1,97 (± 0,21) ^a	-2,55 (± 0,16) ^{abc}	-2,24 (± 0,31) ^a	-3 (± 0,2) ^{ab}	-2,82 (± 0,21) ^a	-2,84 (± 0,52) ^a
	0,32	-2,43 (± 0,78) ^{ab}	-3,36 (± 0,65) ^{bc}	-2,36 (± 0,72) ^{ab}	-3,1 (± 0,35) ^{bc}	-2,51 (± 0,55) ^{ab}	- 3,48 (± 0,35) ^b	-3,22 (± 0,31) ^a	-4,1 (± 0,54) ^a
68%	0,38	-3,85 (± 0,07) ^c	< - 4,5 ^d	-3,63 (± 0,32) ^c	< - 4,5 ^d	-4,15 (± 0,36) ^b	< - 4,5 ^c	< - 4,5 ^b	< - 4,5 ^b
	0,28	-3,08 (± 0,38) ^{abc}	< - 4,5 ^d	-2,81 (± 0,76) ^{abc}	< - 4,5 ^d	-3,47 (± 0,94) ^b	< - 4,5 ^c	-3,82 (± 1,11) ^a	< - 4,5 ^b
	0,22	-2,66 (± 0,7) ^{abc}	< - 4,5 ^d	-2,65 (± 0,61) ^{abc}	< - 4,5 ^d	-2,93 (± 0,53) ^{ab}	< - 4,5 ^c	-4,17 (± 0,98) ^a	< - 4,5 ^b

- Pour chaque souche, 180 min et 960 min: pas de différence significative de la survie pour 68% HR et 43% HR
- Pour une même vitesse de séchage à différentes HR : différence significative pour chaque souche → la vitesse de séchage n'est pas un paramètre crucial pour améliorer la mort cellulaire

- Le paramètre le plus influent pour la mort cellulaire est le niveau d'HR (68% HR)

HR (%)	Etat à 180 min	Cultivabilité entre 180 min et 960 min	Hypothèses du phénomène induit pendant le séchage
75 ($a_w=0,75$)	Liquide	Stable	
68 ($a_w=0,68$)	Visqueux	Diminution	Stress osmotique + Oxydation + Mobilité moléculaire
43 ($a_w=0,43$)	Sec	Stable	
11 ($a_w=0,11$)	Sec	Stable	Conservation

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

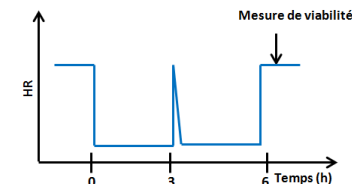
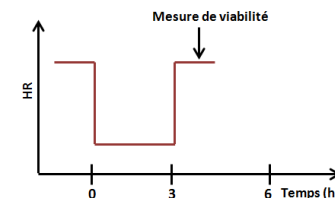
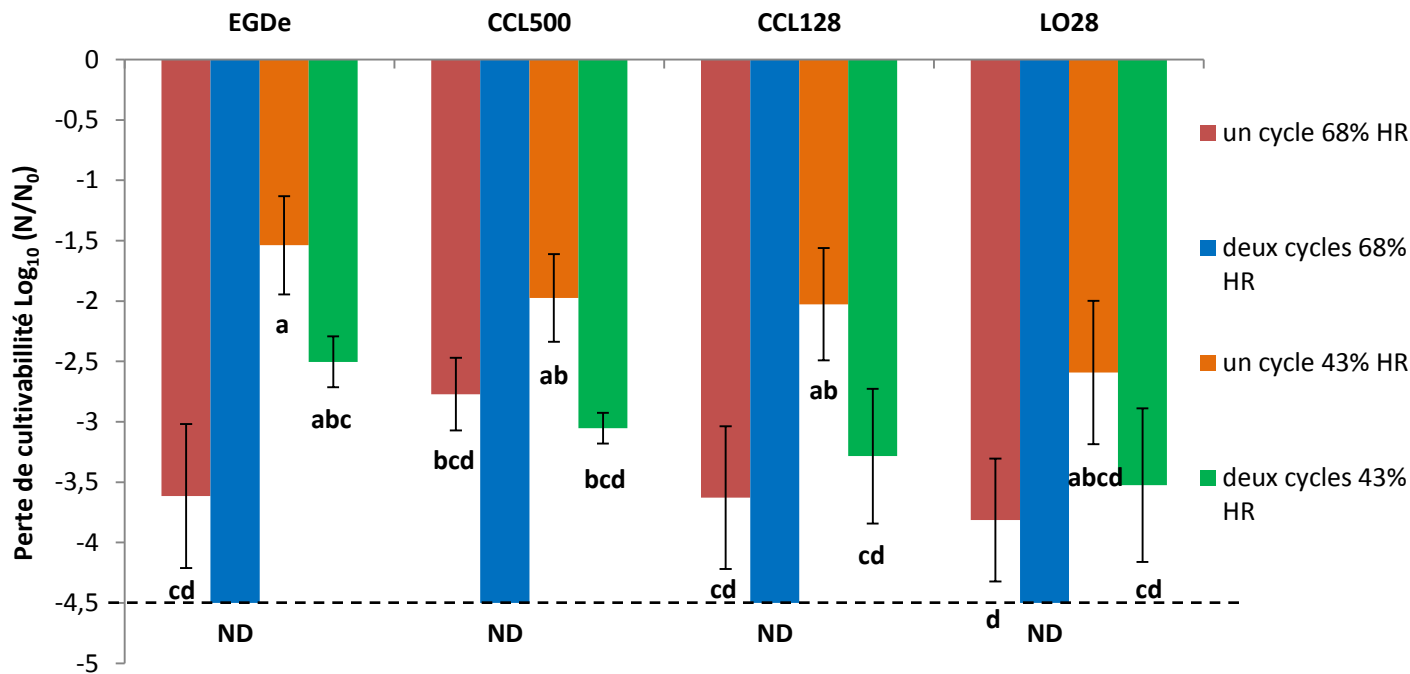
5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

Influence de cycles de déshydratation et réhydratation sur la survie de *L. monocytogenes*

Séchage à 68% et 43% d'HR de 180 min → réhydratation rapide → séchage 180 min → réhydratation rapide



- 2 cycles de déshydratation-réhydratation entraînent une plus grande perte de cultivabilité
- Deuxième cycle ne permet pas d'avoir une diminution logarithmique identique au premier cycle à 43% d'HR
- Aucune cultivabilité bactérienne après 2 cycles à 68% d'HR

- **Hypothèses :** Cellules fragiles tuées lors du 1^{er} cycle
Cellules survivantes → adaptation, résistance ?

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

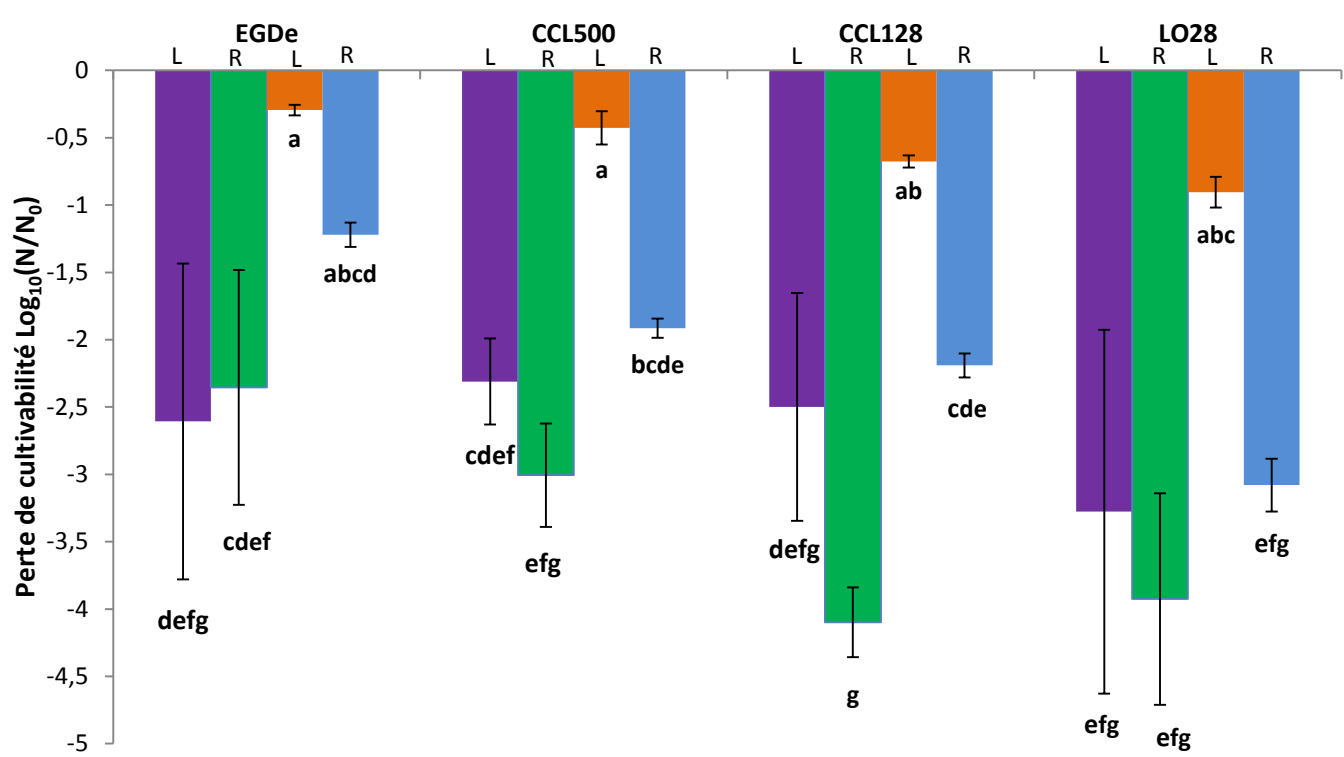
4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

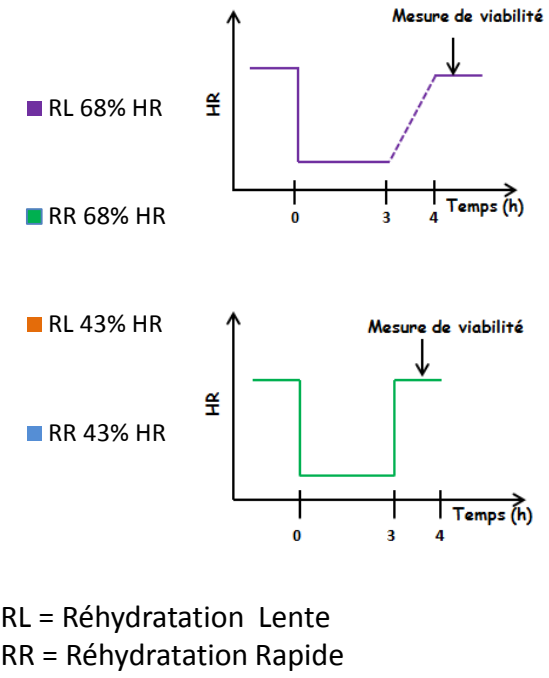
6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

Impact de la réhydratation sur la survie de *L. monocytogenes*



(Séchage de 180 min)



- 43% HR : réhydratation rapide plus délétère pour les cellules
→ Survie cellulaire influencée par le mode de réhydratation
- 68% HR : réhydratation rapide ou lente pas de différence significative dans la survie cellulaire

➤ **Hypothèse** : Rupture membranaire lors d'une réhydratation rapide ?

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ **Résultats et Discussion**

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

5) **Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation**

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

➤ Analyse par cytométrie en flux

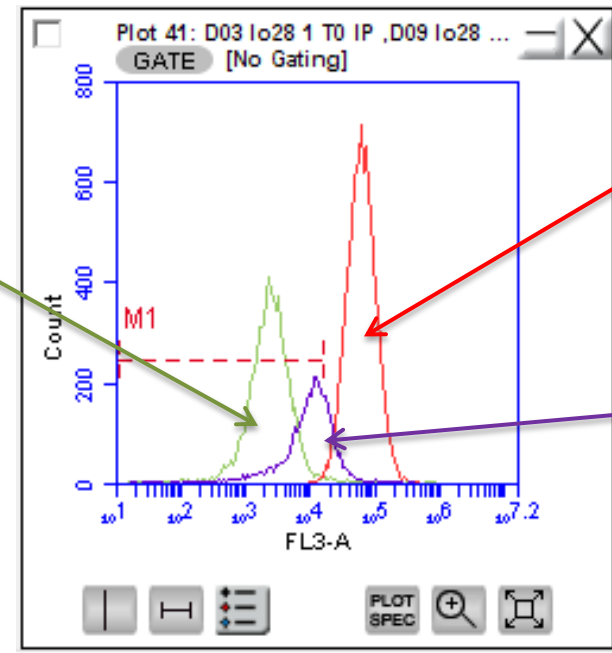
Séchage des 4 souches de *L. monocytogenes* à 68% HR et 43% HR pendant 180 min + réhydratation lente ou rapide

+

Iodure de propidium

➔
Cytométrie en flux

Témoin négatif :
cellules vivantes + IP

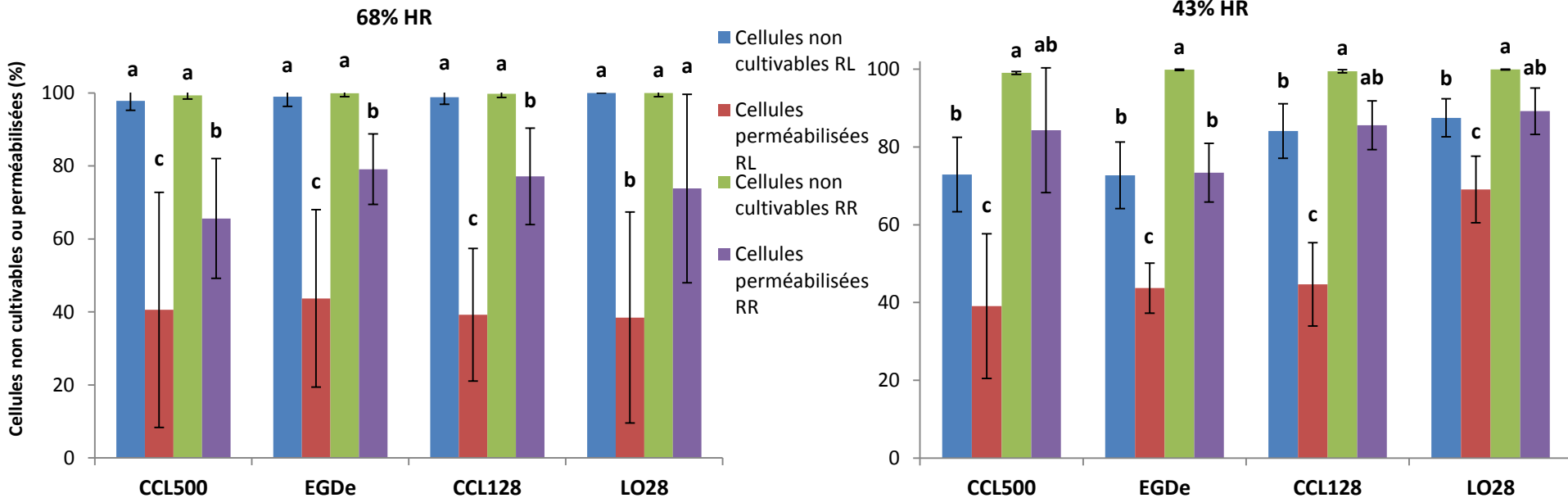


Témoin positif:
cellules mortes
(90°C ,45 min) + IP

Cellules stressées

Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

➤ Mesure en cytométrie en flux du % de cellules incorporant l'IP/ mesure de la cultivabilité par UFC



RL = Réhydratation Lente
RR = Réhydratation Rapide

- 43% HR : % cellules non cultivables et perméabilisées montrent une différence significative entre RR et RL
- 68% HR : % cellules non cultivables ne montrent pas de différence significative mais % de cellules perméabilisées montrent une différence significative entre RL et RR
- Différence significative entre cellules non cultivables et perméabilisées quelque soit le type de réhydratation

→ Perméabilisation joue un rôle dans la mort cellulaire pendant la déshydratation-réhydratation mais d'autres phénomènes sont également mis en cause (agrégation protéique, oxydation...)

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

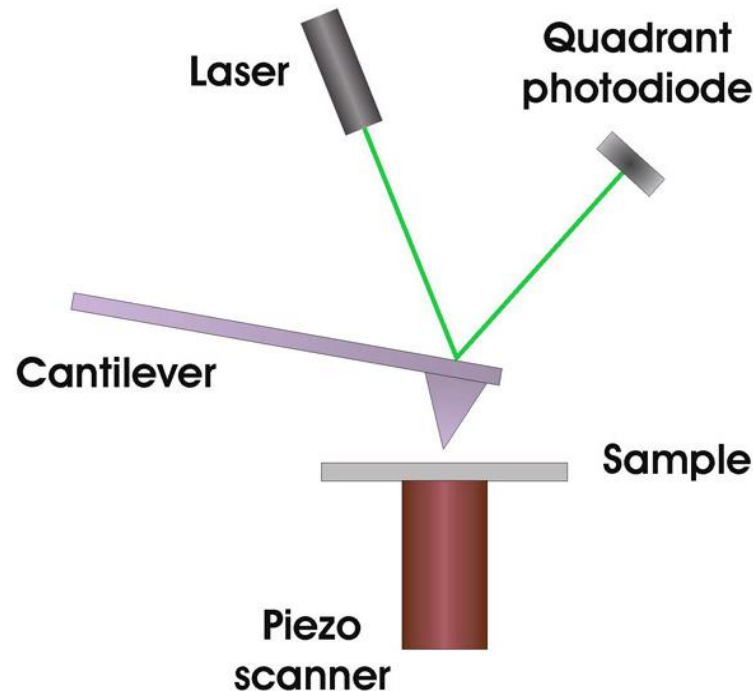
5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

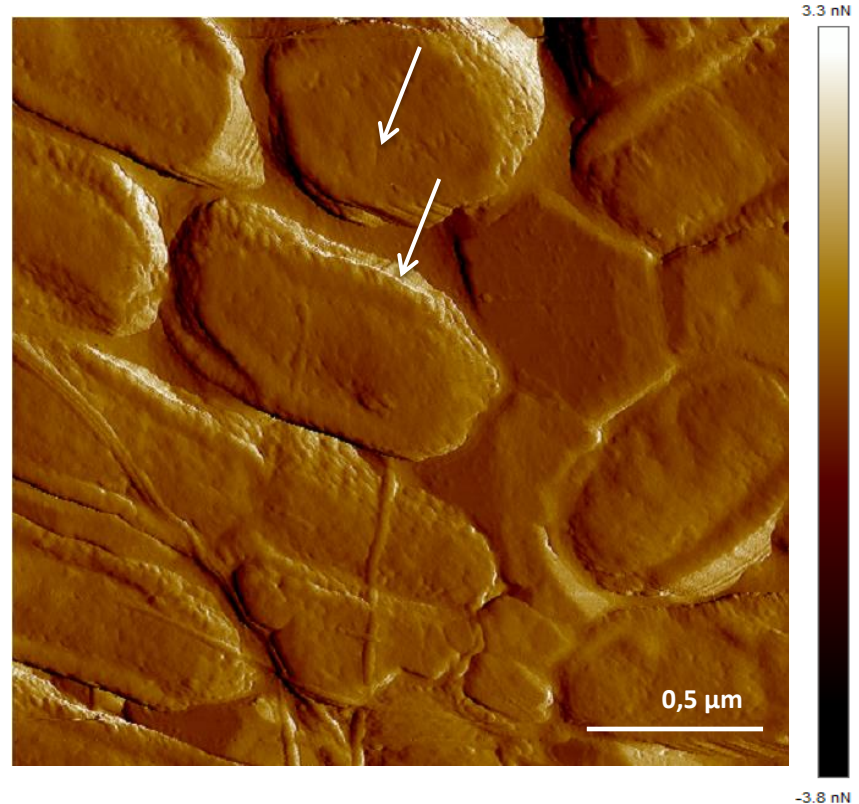
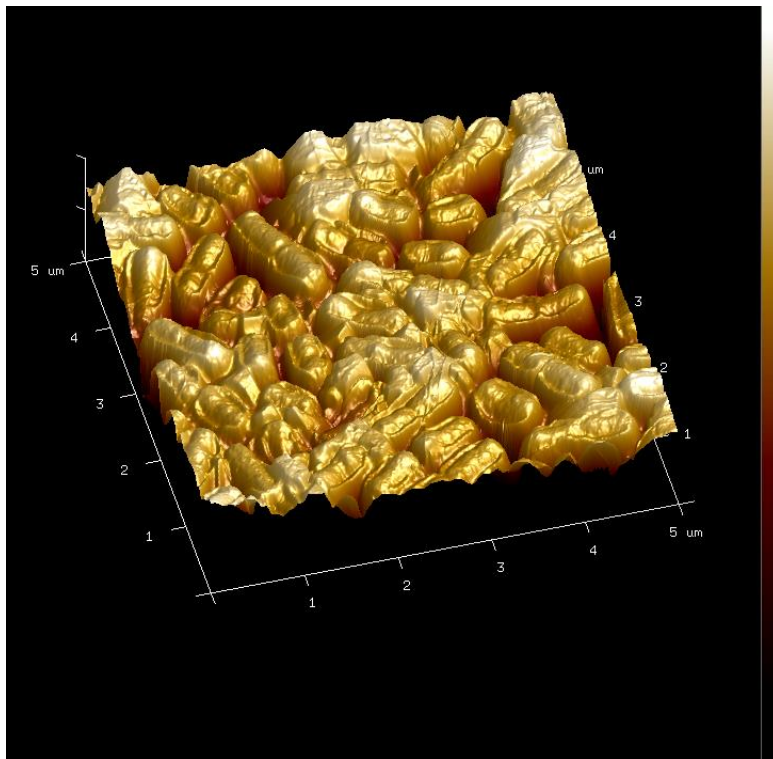
Principe : Détection des forces atomiques s'exerçant entre la surface de l'échantillon et une pointe d'à peine quelques micromètres de hauteur.

Permet de balayer la surface d'un échantillon et de visualiser la topographie de la surface de l'échantillon



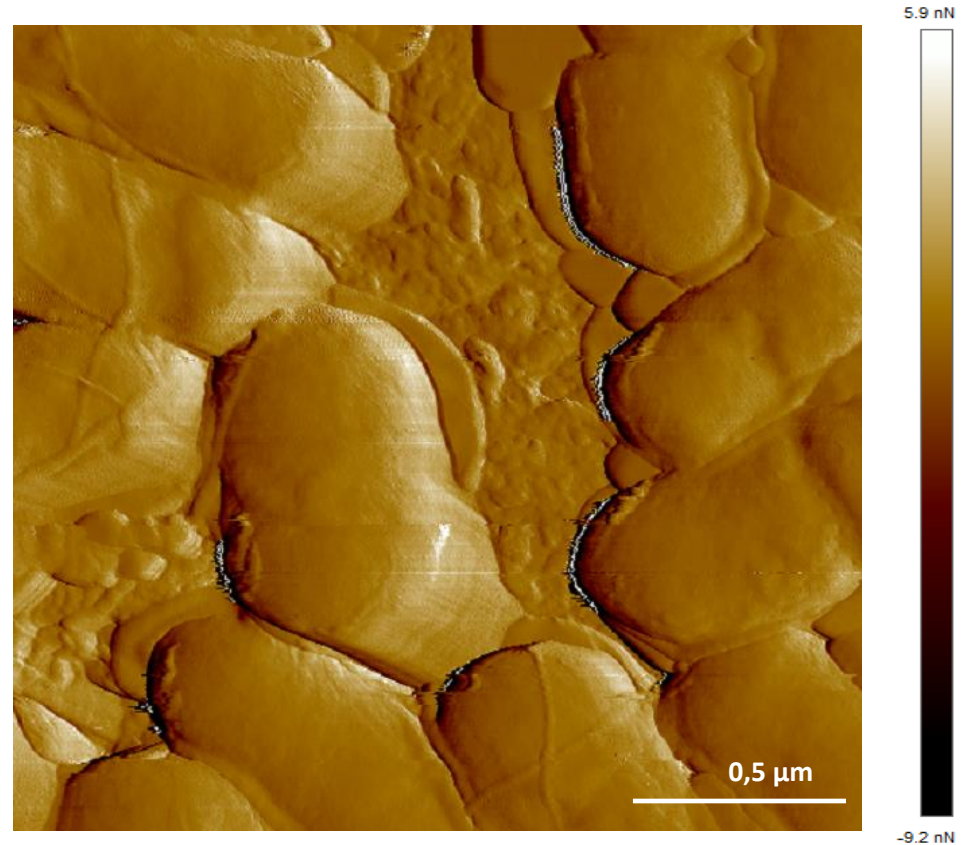
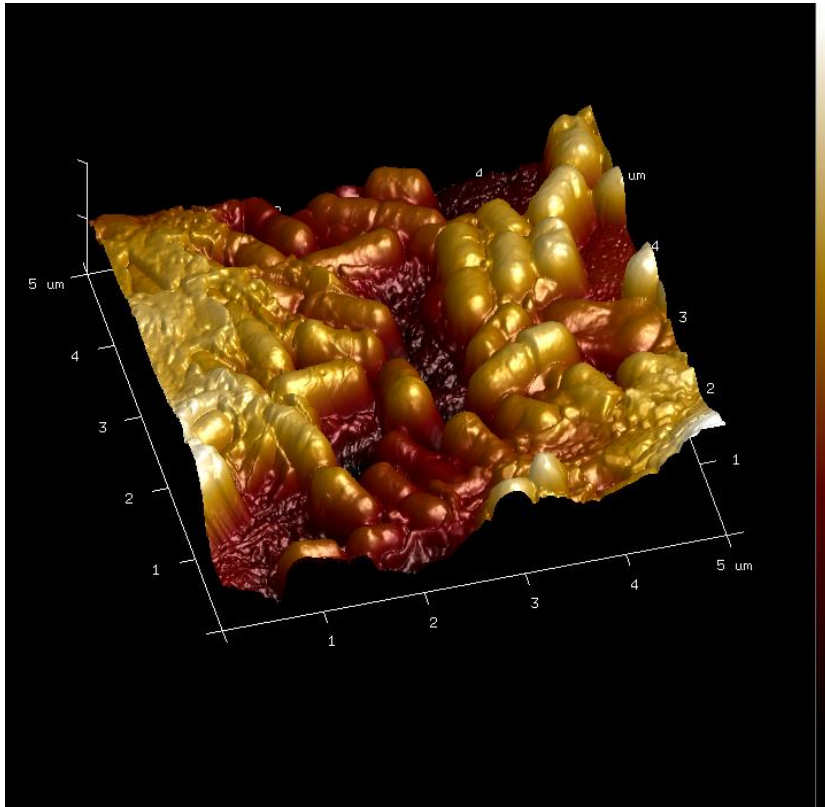
- Observation de la morphologie bactérienne après des séchages de 180 min à 68% et 43% et 11% HR sans réhydratation

EGDe 68% HR



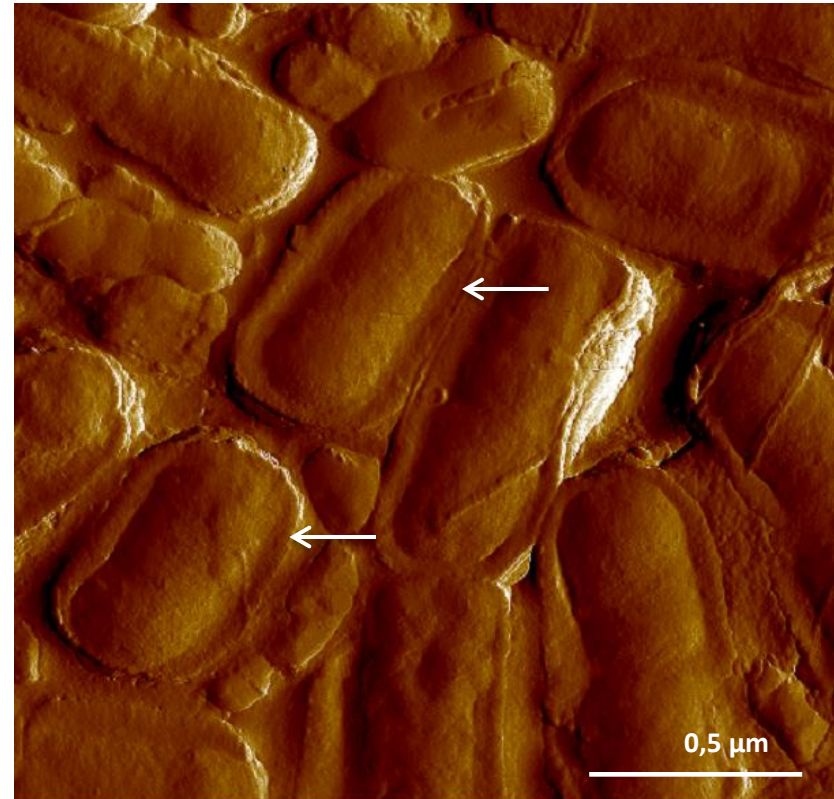
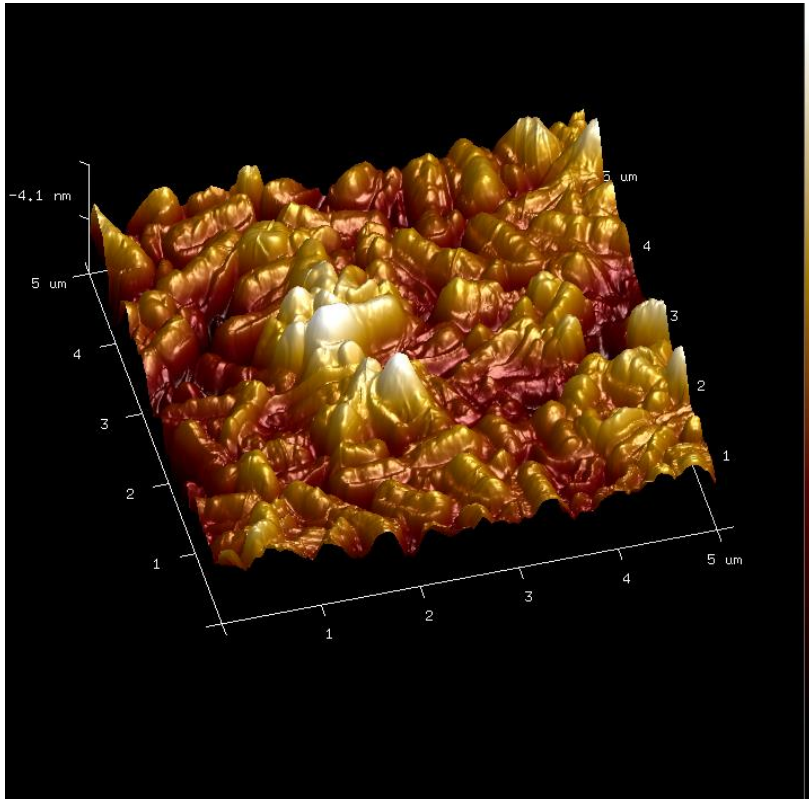
- Enveloppe cellulaire pas bien définie. Rugosité cellulaire.

EGDe 43% HR



➤ Cellules individualisées, pas de différence de taille entre les cellules séchées à 68% et 43% d'HR.

EGDe 11% HR



1.8 nN

-1.6 nN

0,5 μm

➤ Cellules individualisées, plus petites qu'à 68% et 43% HR. L'enveloppe cellulaire semble s'étaler sur la surface contrairement aux autres séchages testés.

➤ Problématique

➤ Approche expérimentale

➤ Résultats et Discussion

Optimisation de conditions de séchage pour la destruction de *L. monocytogenes*

1) Influence de l'humidité relative

2) Influence de la vitesse de déshydratation

3) Impact de cycles de déshydratation et réhydratation

4) Impact de la réhydratation après séchage

5) Rôle de la perméabilisation membranaire après déshydratation et réhydratation

6) Observation de la morphologie bactérienne après séchage par Microscopie à Force Atomique (AFM)

➤ Conclusions et perspectives

- Le comportement de *L. monocytogenes* face au séchage et à la réhydratation est souche dépendant
- La **condition optimale de séchage** pour la destruction de *L. monocytogenes* est une HR de 68% (mort en continue au cours du temps)
- **Cycle de séchage** : intéressant du point de vue technologique car plus de mortalité cellulaire mais possibilité de sélectionner des cellules résistantes
- **Etape de réhydratation** après séchage importante car responsable de la majorité de la perte cellulaire : mais à 68% HR, le mode de réhydratation n'influence pas la survie
- La **perméabilisation membranaire** joue un rôle dans la déshydratation-réhydratation mais elle ne semble pas être le seul facteur causant la mort cellulaire
- Différences de la morphologie bactérienne à différentes humidités relatives

- Etude de la **modification cellulaire** lors du séchage:
 - Etude de l'oxydation cellulaire pendant le séchage en cytométrie en flux et en spectroscopie à fluorescence
 - Analyse de la structure cellulaire après séchage par Spectroscopie à Transformée de Fourier (FTIR)

- **UMR-PAM** : Laurent Beney, Patrick Gervais, Cosette Grandvalet, Stéphane Guyot
- **ANSES** : Brigitte Carpentier, Olivier Firmesse, Danielle Chassaing, Laurent Guillier, Anaïs Overney
- **INRA Theix** : Michel Hébraud, Ingrid Chafsey, Christophe Chambon
- **IRSTEA Antony** : Onrawee Laguerre, Denis Flick, Evelyne Derens, Jérôme Gahartian, Graciela Alvarez, Logan Lecoq
- **MF Conseil** : Jacques Guilpart
- **DESSICA** : Adam Tchaikowski
- **Groupe Labeyrie** : Yves Gasnier

Merci de votre attention !