UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

Ecole doctorale Environnement-Santé

THÈSE

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

Discipline : Science de l'alimentation

Emilie LANG

Soutenue le : 07.12.16

COMPRÉHENSION DE L'INACTIVATION DE BACTÉRIES PATHOGÈNES PRÉSENTES DANS DES PRODUITS ALIMENTAIRES DÉSHYDRATÉS

Directeur de thèse :

Pr. Patrick GERVAIS

Co-encadrants :

Pr. Jean-Marie PERRIER-CORNET

Dr. Stéphane GUYOT

Jury :

Fabrice MARTIN-LAURENT	Directeur de recherche	INRA Dijon	Président du jury
Stéphane DELAUNAY	Professeur	ENSAIA / Université de Lorraine	Rapporteur
Philippe SCHMITT	Professeur	Université d'Avignon	Rapporteur
Muriel THOMAS	Directeur de recherche	INRA Jouy-en-Josas	Examinateur
Patrick GERVAIS	Professeur	Agrosup Dijon	Directeur de thèse
Jean-Marie PERRIER-CORNET	Professeur	Agrosup Dijon	Co-encadrant
Pablo ALVAREZ-MARTIN	Docteur	Novolyze	Membre du jury

Unité Mixe de Recherche – Procédés Alimentaires et Microbiologiques

Equipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques

Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse et directeur de l'UMR PAM, le Pr. Patrick GERVAIS, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je lui suis également très reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise, sa sympathie et sa bienveillance. J'ai beaucoup appris et progressé à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Je remercie également mes deux co-encadrants, le Pr. Jean-Marie PERRIER-CORNET et le Dr. Stéphane GUYOT, pour leur soutien et leur disponibilité tout au long de ces trois années (et quelque mois) ainsi que pour leurs qualités humaines.

Je souhaite également remercier M. Karim-Franck KINOUCHE et M. Nicolas BRAUN, co-fondateurs de la société Novolyze, pour m'avoir accueillie au sein de leur entreprise, pour m'avoir fait confiance et soutenue pendant cette période. Je lui suis également très reconnaissante envers le Dr. Pablo ALVAREZ-MARTIN pour le temps qu'il m'a accordé et ses conseils.

Merci à Fabrice MARTIN-LAURENT d'avoir présidé mon jury de thèse et également pour avoir participé à mes réunion de comité de thèse. Mes remerciements s'adressent également aux Pr. Stéphane DELAUNAY et Pr. Philippe SCHMITT pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et également au Dr Muriel Thomas d'avoir examiné l'ensemble de mes travaux. Je remercie tous les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux, leurs conseils et les échanges très enrichissant que j'ai eu avec eux.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, le Pr. Frédéric DALLE, le Dr. Fabrice MARTIN-LAURENT et le Dr. Emmanuel GUEDON, pour leurs précieux conseils durant les réunions annuelles. Je remercie particulièrement le Pr. Frédéric DALLE pour m'avoir permis de me former aux techniques (et à toutes leurs subtilités) de cultures des cellules humaines Caco-2, ce qui fut essentiel pour la finalisation de mon travail.

Je tiens également à adresser un grand remerciement à tout le personnel du laboratoire. Merci donc au Pr. Laurent BENEY, directeur de l'équipe PMB, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe ainsi que pour ces conseils, mais également merci à Mélanie, Hélène, Shaliha, Pascale, Carine, Alexandre (GAUDRY) et Sylvie. Je n'oublie pas Florence sans qui certains problèmes administratifs auraient été insurmontables.

De même, je tiens à remercier tout le personnel de Novolyze, entreprise partenaire de ces travaux. Merci ainsi à Amaury, Moussah, Florent, Quentin, Laure et PO. Un merci particulier à Marie, pour tous les moments passés ensembles, pour sa gentillesse, pour sa présence et son écoute en toutes circonstances, et Hanane, pour sa compréhension, son franc-parler et sa bonne humeur. Je pense également à tous ceux que j'ai croisés et qui ne sont plus chez Novolyze, en particulier Ariane, Lucile, Jamil, Stéphanie et bien sûr Marine avec qui j'ai passé de bons moments.

Je désire remercier tous ceux qui ont travaillé à mes côtés, qui mon aussi soutenue pendant cette période et qui ont également participé aux bons moments que j'ai passé à Dijon. Merci à Alexandre (CHARRIAU), pour ces infos toujours fiables, à Cécile, pour les séances (plus ou moins) intensives de natation, à Sébastien, pour avoir mis l'ambiance à la course de Seyssuel, à Lucie, pour sa réassurance, et Richtier, pour avoir amené le soleil. Merci également aux thésards et anciens thésards qui ont partagé mon bureau : merci à Cyril, pour sa découverte du muscle du badminton et d'avoir reconnu que les UV passent à travers les vitres, à Adeline, pour sa capacité d'adaptation à de petite surface, à Chloé, pour ses expressions toujours plus surprenantes les unes que les autres et ses questions existentielles (la tête de …), et enfin à Fiona, pour avoir cheminé avec moi (dans la bibliothèque avec les guêpes, pendant les moments de folie au P2, tous les congrès et bien sûr tous les autres moments…). Je pense également à tous ceux que j'ai croisés : Pauline, Julia, Alexandre (COLAS), Charline, Bérengère, Jennifer, Layla, Aurore (PALUD), Antonio, Emeric, Aurore (BODZEN)…

Un grand merci à ma famille et à mes amis pour m'avoir soutenue et encouragée au cours de ces années de thèse mais aussi pour toutes les autres années.

Résumé

Les produits alimentaires secs sont courants dans l'industrie agroalimentaire. Cependant, leur innocuité n'est pas toujours assurée et de nombreux cas de toxi-infections alimentaires collectives à travers le monde sont annuellement recensés. Deux bactéries pathogènes sont particulièrement impliquées, l'une correspond à grand nombre de cas, *Salmonella enterica*, et l'autre est reconnue pour sa capacité à résister aux perturbations environnementales, *Cronobacter* spp.. Une compréhension plus poussée de l'impact du séchage et traitement thermique à l'état sec peut permettre une optimisation des procédés de de décontamination des produits alimentaires secs et contribuer à réduire le nombre de toxiinfections alimentaires. Dans un premier chapitre, une attention particulière a été portée au procédé de séchage de microorganismes pathogènes qui peut, s'il est conduit de manière rapide, réduire considérablement la cultivabilité microbienne. De cette façon, le séchage peut être considéré comme une étape supplémentaire de décontamination à condition d'en optimiser les conditions d'application. Puis dans un deuxième chapitre, l'impact de la réhydratation, rarement traitée jusqu'à présent, a été étudié afin de proposer des conditions permettant de maximiser l'inactivation bactérienne. Cette étude remet partiellement en cause les dénombrements de bactéries pathogènes dans les aliments qui peuvent être, dans quelque cas, sous estimées du fait de l'utilisation de réhydratation rapide. Dans un troisième chapitre, l'application de différents traitements thermiques sur du lait en poudre, destiné à une population dite sensible, a permis de comprendre le rôle couplé de l'activité de l'eau et de la température sur l'efficacité du traitement thermique à l'état sec mais également de proposer un modèle d'inactivation thermique des pathogènes. Il a été notamment possible de définir un paramètre représentatif de l'effet de l'activité de l'eau (y_{aw}). Les mécanismes de mort cellulaire pour les deux bactéries ont été ensuite étudiés, que ce soit après un séchage ou après un traitement thermique. Il apparait clairement que le séchage induit majoritairement une perméabilisation de la membrane tandis que le traitement thermique des cellules viables séchées dégrade majoritairement l'activité enzymatique en détruisant peu la membrane. Finalement, il a été montré que la virulence des deux pathogènes étudiés est augmentée par le séchage mais que le traitement thermique à l'état sec n'a pas d'impact sur cette virulence. Les connaissances apportées par cette étude peuvent être utiles d'un point de vue industriel, afin d'optimiser au mieux les conditions d'application des différents procédées pour une inactivation bactérienne maximale.

Mots clés :

Salmonella enterica, *Cronobacter* spp., séchage, réhydratation, traitement thermique, physiologie, virulence

Abstract

Dried food products are common in food industry. Nevertheless, their safety is not well insured, involving numerous outbreaks every years around the world. Particularly, two pathogenic bacteria are of interest, one of them due to its number of cases, *Salmonella enterica*, and the other one due to its ability to survive environmental perturbations, *Cronobacter* spp.. A deeper comprehension of drying and heat treatment in dried state impact could lead to an optimization of drying and heating processes, insuring food safety. In the first instance, drying was considered as a supplementary decontamination step by optimizing its conditions of use. In a second phase, the rehydration impact was studied in order to found optimal conditions of pathogen inactivation. The study questions the rehydration currently puts in practice for food safety analysis. In a third phase, several heat treatments on a dried food product, intended to susceptible population, permitted to understand the specific role of water activity on the efficiency of heat treatment in dried state, and also propose a modelling for bacterial heat inactivation. In addition, it was possible to define two new parameters which represent the effect of temperature (z_T) and the effect of water activity (y_{aw}). Fourth, cellular death mechanisms for both studied bacteria, during the drying or during the heat treatment, were considered. It was clear that drying involved mainly membrane damages whereas heat treatment involved mainly enzymatic damages. Finally, in a fifth part, it was shown that virulence properties of both studied bacteria were affected by drying, increasing invasion capacity, but not by heat treatment in dried state. To finish, the knowledges brought by this study are useful for industrial point of view, in the case of drying and heat process optimization and also by proposing biological indicators to valid process efficiency *in situ*.

Keywords:

Salmonella enterica, *Cronobacter* spp., drying, rehydration, heat treatment, physiology, virulence

Symboles et Abréviations

ANSES	Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
a_W	Activité de l'eau
CFU	Colonie Forming Unit, Unité Formant Colonie (UFC)
CTC	5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazolium Chloride
ΔH	Enthalpie de vaporisation
D	Valeur de réduction décimale
D_T	Valeur de réduction décimale à la température T
$D_{T,aw}$	Valeur de réduction décimale à la température T et une aW donnée
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Food and Drug Administration, Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments
FSMA	Food Safety Modernization Act
GTP	Guanine Tyrosine Phosphate
HPP	High Pressure Prossessing, Procédé haute pression
HSP	Heat Shock Protein, Protéine de stress thermique
InVS	Institut de Veille Sanitaire
N	Charge microbienne à un instant t
N_0	Charge microbienne initiale
OD_{600}	Optical Density at 600 nm, Densité optique à 600 nm
OMP	Outer Membrane Protein, Proteine de la membrane externe
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p	Pression partielle de vapeur d'eau
P*	Pression saturante de vapeur d'eau
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pef	Plasmid endcoded fimbriae, fimbriae encodé par le plasmide
PI	Propidium iodide, Iodure de propidium

PIF	Powdered Infant Formula, Préparation en poudre pour nourrissons
PS	Produits Secs
R	Consente des gaz parfaits
RH	Relative Humidity, Humidité relative
ROS	Reactive Oxygen Species, Espèces réactive de l'oxygène
SCV	*Salmonella* Containing Vacuole, Vacuole contenant *Salmonella*
SOD	Super Oxyde Disutase
SPI	*Salmonella* Pathogeny Island, Ilots de pathogénie de *Salmonella*
spp.	Species, éspèces
subsp.	Sub-specie, sous-espèces
STEC	*Shigella* Toxin *Escherichia coli*
T	Température
T_m	Melting temperature, température de transition de phase gel-liquide cristallin
T1SS	Type I Secretion System, Système de sécrétion de type I
T3SS	Type III Secretion System, Système de sécrétion de type III
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
VBNC	Viable But Non-Culturable, Viable mais non cultivable
y_{aw}	Augmentation de l'activité de l'eau nécessaire pour diviser la valeur de D par 10
z_T	Augmentation de la température nécessaire pour diviser la valeur de D par 10

Table des Matières

Introduction 1

Synthèse Bibliographique 4

1. Les produits alimentaires déshydratés et leur lien avec la sécurité microbiologique 5

1.1. Les produits alimentaires secs 5

1.2. Origines de la contamination des produits secs 8

1.3. Persistance des bactéries dans les produits secs 9

1.4. Epidémiologie des produits alimentaires secs 12

1.4.1. Toxi-infections alimentaires 12

1.4.2. Historique des rappels de produits contaminés 14

1.4.3. Le cas des produits alimentaires pour nourrissons 15

2. *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp., deux bactéries contaminantes des produits secs 18

2.1. *Salmonella enterica* et *Cronobacter sakazakii* 18

2.1.1. *Salmonella enterica*, bactérie pathogène courante de l'industrie agroalimentaire 18

2.1.2. *Cronobacter* spp., pathogène émergent de l'industrie agroalimentaire 20

2.2. Séchage/réhydratation de *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp. 23

2.2.1. Les échanges d'eau entre la cellule et son environnement lors d'un séchage et d'une réhydratation 23

2.2.2. Résistance des bactéries au séchage 24

2.2.2.1. Mécanismes actifs de la résistance au séchage 24

2.2.2.2. Mécanismes passifs de la résistance au séchage 28

2.2.2.2.1. Mécanismes passifs en lien avec la membrane 28

2.2.2.2.2. Mécanismes en lien avec les macromolécules 29

2.2.3. Conséquence d'un cycle de séchage/réhydratation sur les cellules bactériennes 30

2.2.3.1. Conséquence du séchage 30

2.2.3.2. Conséquence de la réhydratation 32

2.3. La réponse intégrée aux stress 33

2.4. *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp., deux bactéries entéroinvasives 35

2.4.1. La virulence chez *Salmonella* spp. 35

2.4.1.1. Schéma général du cycle de virulence chez *Salmonella* spp. 35

2.4.1.2. Régulation de la virulence chez *Salmonella* spp. et son lien avec les perturbations environnementales 39

2.4.2. La virulence chez *Cronobacter* spp. 41

3. La décontamination des produits alimentaires secs : un procédé complexe 44

3.1. Méthodes thermiques de décontamination 44

3.1.1. Problèmes fondamentaux de la décontamination thermique des produits secs 44

3.1.1.1. Principe du traitement thermique 44

3.1.1.2. Propriétés physiques et chimiques des produits secs et leur contamination. 45

3.1.1.3. Le rôle de l'eau 46

3.1.2. Les techniques utilisées pour la décontamination thermique des produits secs 47

3.1.3. Modélisation des données de traitements thermiques pour obtenir des barèmes de décontamination 48

3.1.4. Validation de procédés de décontamination 52

3.2. Impact des traitements thermiques sur les cellules bactériennes végétatives 54

3.2.1. Effet de la température sur les membranes 54

3.2.2. Effet de la température sur les protéines 56

3.2.3. Impact d'un stress thermique sur les acides nucléiques 57

3.3. Les autres méthodes et leurs limites 57

Objectifs de l'Etude 60

Chapitre 1 Impact des Conditions de Séchage sur l'Inactivation de Microorganismes Pathogènes 63

1. Introduction 64

2. Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk 65

2.1. Abstract 65

2.2. Keywords 65

2.3. Introduction 65

2.4. Materials and methods 67

Article 1

2.4.1. Bacteria species 67
2.4.2. Drying conditions 67
2.4.2.1. Drying atmosphere 67
2.4.2.2. Drying kinetics of PBS and milk by following the weight loss 68
2.4.2.3. Preparation of the initial cellular suspension 68
2.4.2.4. Drying in PBS 68
2.4.2.5. Drying in milk 69
2.4.3. Drying effects on bacterial cells 69
2.4.3.1. Effects of drying on the loss of cultivability 69
2.4.3.2. Effects on growth recovery capacity 69
2.4.3.2.1. Growth curves of dehydrated–rehydrated bacteria 69
2.4.3.2.2. Calculation of the delay in growth recovery 69
2.4.4. Statistical analysis 70
2.5. Results 70
2.5.1. Evolution of the loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time 71
2.5.1.1. Drying in PBS 71
2.5.1.2. Drying in milk 71
2.5.2. Evolution of the loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as function of the a_W evolution 73
2.5.2.1. Evolution of the loss of PBS and milk weights during drying 73
2.5.2.2. Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as function of the corresponding substrate a_W level 74
2.5.3. Effects of drying on growth recovery capacity of cultivable cells 76
2.5.3.1. Effects of the initial drying kinetics 76
2.5.3.2. Effects of the final drying level 77
2.6. Discussion 78
2.7. Conclusion 81
2.8. Acknowledgement 81

Article 1

3. Conclusion du chapitre 82

Chapitre 2 Impact des Conditions de Réhydratation sur l'Inactivation de Microorganismes Pathogènes Déshydratés 83

1. Introduction 84

2. Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics 85

2.1. Abstract 85

2.2. Introduction 85

2.3. Materials and methods 87

2.3.1. Bacterial strains 87

2.3.2. Drying conditions 87

2.3.2.1. Drying atmosphere 87

2.3.2.2. Preparation of the initial cell suspension 87

2.3.3. Rehydration impact after different drying intensities 88

2.3.3.1. Drying and instantaneous rehydration 88

2.3.3.2. Drying and rapid rehydration 89

2.3.3.3. Drastic drying and slow rehydration rates 89

2.3.4. Statistical analysis 89

2.4. Results 90

2.4.1. Rehydration impact after different drying intensities 90

2.4.2. Rehydration impact after a drastic drying 91

2.5. Discussion 92

2.6. Conclusion 93

3. Conclusion du chapitre 94

Chapitre 3 Décontamination Thermique de Microorganismes Pathogènes sur une Poudre Alimentaire et Modélisation des Données 95

1. Introduction 96

2. Thermal inactivation of dried foodborne pathogens in milk powder 97

2.1. Highlights 97

Article 2

2.2. Abstract 97
2.3. Keywords 97
2.4. Introduction 98
2.5. Materials and methods 99
2.5.1. Bacterial strains and cultivations conditions 99
2.5.2. Inoculation of powder 100
2.5.3. Drying process 100
2.5.4. Thermal treatment 100
2.5.5. Model building 101
2.5.5.1. Primary modelling 101
2.5.5.2. Secondary modelling 101
2.5.5.2.1. Effect of temperature 101
2.5.5.2.2. Effect of water activity 101
2.5.6. Statistical analyses 102
2.6. Results 102
2.6.1. Primary modelling 102
2.6.2. Effect of temperature and water activity on the efficiency of the thermal inactivation of bacteria in milk powder: secondary modelling – adapted from the Bigelow model 105
2.7. Discussion 107
2.8. Conclusion 109
2.9. Acknowledgement 110

3. Isolement de bactéries environnementales et détermination de leur potentiel en tant que traceurs biologiques 111

4. Conclusion du chapitre 114

Chapitre 4 Mécanismes Cellulaires Impliqués dans l'Inactivation des Bactéries Pathogènes lors d'un Séchage et d'un Traitement Thermique Successifs 115

1. Introduction 116

2. Cellular injuries of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* exposed to drying and successive heat treatment 117

Article 4

2.1. Abstract 117
2.2. Keywords 117
2.3. Introduction 117
2.4. Materials and methods 119
2.4.1. Strains cultivations 119
2.4.2. Inoculation of powder 119
2.4.3. Drying process 120
2.4.4. Thermal treatment 120
2.4.5. Flow cytometry analysis 120
2.4.5.1. Labelling of bacterial cells 120
2.4.5.2. Flow cytometry conditions 121
2.4.6. Statistical analyses 121
2.5. Results 121
2.5.1. Impact of drying on bacterial cells 121
2.5.2. Impact of heat treatment on bacterial cells 123
2.6. Discussion 126
2.7. Conclusion 128
2.8. Acknowledgement 129

3. Conclusion du chapitre 130

Chapitre 5 Impact du Séchage et du Traitement Thermique sur la Virulence des Pathogènes Etudiés 131

1. Introduction 132

2. Virulence of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* in milk powder exposed to drying and successive heat treatment 133

Article 5

2.1. Abstract 133
2.2. Keywords 133
2.3. Introduction 133
2.4. Materials and methods 135
2.4.1. Strains cultivations 135

2.4.2. Inoculation of milk powder 135
2.4.3. Drying process 135
2.4.4. Thermal treatments 136
2.4.5. Virulence assays 136
2.4.5.1. Caco-2 cells maintenance and preparation 136
2.4.5.2. Bacterial samples preparation 137
2.4.5.3. Invasion and multiplication in Caco-2 cells 137
2.4.6. Statistical analyses 137
2.5. Results and discussion 137
2.5.1. Impact of drying on cultivability and bacterial virulence 137
2.5.2. Impact of heating in dried state on cultivability and virulent bacteria 140
2.6. Conclusion 142
2.7. Acknowledgement 142
3. Conclusion du chapitre 143
Discussion Générale 144
Quel est l'impact du séchage sur les bactéries pathogènes ? 145
Quel est l'impact de l'étape de réhydratation sur les bactéries pathogènes ? 147
Quel est l'impact du traitement thermique à l'état sec sur les bactéries pathogènes et pouvons-nous le prédire ? 149
Conclusion et Perspectives 152
Annexes 185
Références Bibliographiques 156

Table des Illustrations

Table des figures

Figure 1 : Développement des microorganismes, limites des réactions biochimiques en fonction de l'a_W et produits alimentaires correspondants 6
Figure 2 : Les produits alimentaires secs au cœur de l'industrie agro-alimentaire, d'après Cuq et al. 2011 (10) 7
Figure 3 : Voies majoritaires de la contamination pré et post-récolte des PS. En rouge : les voies de contamination directes. En bleu : les voies de contamination indirectes 8
Figure 4 : Différents stress environnementaux possiblement rencontrés par *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. au cours de leur cycle de vie 10
Figure 5 : Distribution du nombre de cas de salmonellose pour 100 000 habitants en fonction de l'âge de la population pour l'Union Européenne en 2008 (52) 15
Figure 6 : Représentation schématique de la position du genre *Salmonella* spp. et de sa subdivision en espèces et sous-espèces (87) 18
Figure 7 : Représentation schématique de la position du genre *Cronobacter* et de sa subdivision en espèces et sous-espèces (94) 21
Figure 8 : Représentation des symptômes en fonction de la population atteinte par *Cronobacter* spp. (13) 22
Figure 9 : Représentation schématique des différentes étapes se produisant lors d'un séchage suivi d'une réhydratation 23
Figure 10 : Schéma de la stabilisation d'une protéine par les osmoprotectants (d'après (105)). 1 : Perte d'eau, dénaturation de la protéine. 2 : Présence de solutés compatibles, stabilisation de la structure de la protéine 25
Figure 11 : Présentation des transporteurs majeurs de *Salmonella* spp. impliqués dans la réponse au stress osmotique en présence de solutés compatibles dans le milieu extérieur. a : Réponse primaire, entrée de K^+. b : Réponse secondaire : Entrée de solutés compatibles 25
Figure 12 : Concentration en tréhalose des cellules de *Cronobacter* spp. sans traitement ou après séchage à 25°C dans une enceinte à 20,7% d'humidité relative (d'après (20)) 26
Figure 13 : Modèle d'étirement-relaxation pour les domaines cytoplasmiques de EnvZ lors des changements osmotiques, repris de (113). En orange : résidus histidine 27
Figure 14 : Schéma du repliement des macromolécules en fonction de l'activité de l'eau et les conséquences sur les stress oxydatifs (134). Le site actif est représenté en rose 29
Figure 15 : Différentes phases membranaires rencontrées dans les membranes bactériennes (135) 30
Figure 16 : Micrographe obtenu en microscopie électronique à transmission de *E. coli* K12 stressée osmotiquement à une activité de l'eau d'environ 0,750 (142) 31

Figure 17 : Phénomènes de cross-protection connus chez *Salmonella* spp.. En (a) : Activation d'un gène par deux promoteurs différents, en (b) : Versatilité du senseur, en (c) : Activation d'antagoniste de répresseur, en (d) : Activation en cascade. En orange et en rouge : deux stress différents, en vert et rose : facteur de transcription activé par un senseurr, en bleu turquoise : l'ARN polymérase. D'après (151).....33
Figure 18 : Invasion de *Salmonella enterica* dans un hôte humain. (1) : *S. enterica* est ingérée et va être transportée par le bol alimentaire jusqu'au gros intestin où elle va adhérer à la paroi intestinale et envahir son hôte. (2) : Observation en microscopie à balayage d'une *S.* Enteritidis ayant adhéré à une cellule épithéliale et commençant l'induction de « membrane ruffling » ou boursoufflure membranaire. (3) : Membrane ruffling englobant *S.* Enteritidis. (4) : Une fois arrivée dans la lumière du gros intestin, *Salmonella* s'internalise dans les cellules de la paroi intestinale.....36
Figure 19 : Sécrétion d'une protéine dans la cellule hôte par le T3SS, d'après (181) 37
Figure 20 : Exemple de la complexité de la régulation de SPI-1 et l'impact de la perception de l'environnement sur cette régulation (173, 205).....40
Figure 21 : Pourcentage d'invasion relative de *C. sakazakii* dans des lignées de cellules humaines Caco-2 et INT407 en fonction de la délétion du gène *ompA* et *ompX* codant pour des protéines membranaires (213) 42
Figure 22 : Concept de choc et de rampe lors d'un traitement thermique.....45
Figure 23 : Impact de la taille des particules et du type de contamination sur l'efficacité d'un traitement thermique de même intensité. En 1, la contamination de surface et en 2: la contamination en masse. 45
Figure 24 : Diminution logarithmique d'une population bactérienne à une température T donnée en fonction du temps de traitement et définition graphique de D_T 50
Figure 25 : Influence de la température sur D_T et définition graphique de z 50
Figure 26 : Différentes courbes d'inactivation bactérienne modélisées par le modèle de Weibull en fonction de la valeur de β 52
Figure 27 : Altération de la membrane externe de *Cronobacter sakazakii* observée au microscope électronique à balayage avant (1) et après (2) stress thermique à 47°C pendant 15 min dans du tampon phosphate (248).....55
Figure 28 : Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time in four atmospheres. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL, and the method detection limit was about –4.5 log. Squares and diamonds represent the results in milk and PBS, respectively. (a) *S.* Typhimurium dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S.* Typhimurium dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S.* Typhimurium dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S.* Typhimurium dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii*

dried at 58% relative humidity. Error bars represent standard deviations obtained from triplicates.....72
Figure 29 : Sorption curves of PBS at 20 °C expressed with water content as function of a_W.....74
Figure 30 : Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during drying in air equilibrated at four relative humidity (RH) levels as a function of the calculated suspension a_W. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL and the method detection limit was about –4.5 log. Squares: drying in milk; diamonds: drying in PBS. (a) *S.* Typhimurium dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S.* Typhimurium dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S.* Typhimurium dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S.* Typhimurium dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% RH. Error bars represent SDs obtained from triplicates.....75
Figure 31: Scheme of different rehydration methods used in this study. (a) Instantaneous rehydration in PBS at 0.995 for 1 s. (b) Rapid rehydration in cPBS (concentrated PBS) at 0.950 (about 1 s), holding time at 0.950 for 30 s and diluting in PBS at 0.995 for 1 s before plating. (c) Slow rehydration in cPBS at 0.950 for 1 s and holding at 0.950 by diluting in cPBS for 2 min before plating during which ramp rehydration (i.e. a progressive evolution of rehydration level) occurred on Petri dishes for about 10 min to reach an a_W of 0.995. (d) Very slow rehydration by placing bacteria in a 100% RH atmosphere for 90 min before diluting and plating. R: Rehydration. D: Dilution. P: Plating. Even if only drying at an a_W of 0.11 was presented, rehydration presented in (a) and (b) were also performed to reach an a_W of 0.58, 0.44 and 0.25 in atmosphere RH at 58%, 44% and 25%. 88
Figure 32: Impact of rehydration after drying on cultivability for *C. sakazakii* (A), *S.* Typhimurium (B) and *S.* Senftenberg (C). Dark grey represents the loss of cultivability obtained with instantaneous rehydration and light grey represents the loss of cultivability with rapid rehydration. Error bars represent SD calculated from triplicates and asterisks represent a significant difference between both conditions (t-test, $p<0.05$). The corresponding dataset was presented in S1 Table.....90
Figure 33: Comparison of four rehydration kinetics after 90 min of drying in an atmosphere at 11% RH for *C. sakazakii* (A), *S.* Typhimurium (B) and *S.* Senftenberg (C). The loss of cultivability obtained with instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration is shown going from darker to lighter. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p<0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test. The corresponding dataset was presented in S2 Table. 91
Figure 34 : Representation of effect of temperature, a_w, and bacteria on $D_{T,aw}$ value. (a) Impact of temperature, (b) impact of a_w, and (c) impact of bacteria. Means of $D_{T,aw}$ ( ) and bars represents confidence interval (95%). Means of $D_{T,aw}$ were calculated on all data for a same parameter level.

The confidence interval of each mean of $D_{T,aw}$ was calculated from the general variance of all the experimental points. 104
Figure 35 : Linear regression for the determination of z_T (°C) for each bacterium. Experimental points ( ) and linear regression ( ) were represented for *Escherichia coli* (a), *Salmonella* Typhimurium (b), *Salmonella* Senftenberg (c) and *Cronobacter sakazakii* (d). 105
Figure 36 : Linear regression for the determination of y_{aw} (-) for each bacterium. Experimental points ( ) and linear regression ( ) were represented for *Escherichia coli* (a), *Salmonella* Typhimurium (b), *Salmonella* Senftenberg (c) and *Cronobacter sakazakii* (d). 106
Figure 37 : Présentation des résistances thermiques des traceurs biologiques testés et des pathogènes. En bleu trait plein : le traceur testé, En bleu clair et pointillé : *C. sakazakii*, En bordeaux et pointillé : *S.* Senftenberg, En orange et pointillé : *S.* Tuphimurium. (a) *E. faecium*, (b) Novo1631EC1, (c) Novo1631EC3, (d) Novo1631EC5, (e) Novo1631EC6, (f) Novo1631EM1, (g) Novo1631EM2, (h) Novo1631EM3, (i) Novo1631EM4 et (j) Novo1631EM5 112
Figure 38: Impact of drying on cultivability. Impact of drying on cultivability for each specie; from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg as function of water activity level of drying. Equivalence in logarithmic inactivation was mentioned above each bar. Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates. 122
Figure 39: Impact of drying on permeability and enzymatic activity of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. The number of uncultivable cells was so adjusted to 100% (presented on the left); from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, (a) Impact of drying on permeability for each specie reported to uncultivable cells. Percentage of permeabilized cells were presented with stripe and the ladder on the right, titled, horizontal and vertical stripe for *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, respectively (right axis). (b) Impact of drying on enzymatic activity of each specie reported to uncultivable cells. Percentage of permeabilized cells were presented with stripe and the ladder on the right, titled, horizontal and vertical stripe for *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, respectively (right axis). Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates. 123
Figure 40: Impact of heating in dried state on cultivability of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. Impact of heat treatment on cultivability for each specie; from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Senftenberg as function of heating conditions, namely water activity of milk powder (0.25 or 0.58), heating temperature (90°C or 100°C) and time of

treatment (30 s or 120 s). Equivalence in logarithmic inactivation was mentioned above each bar. Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates. 124

Figure 41: Impact of heating in dried state on permeability and enzymatic activity of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. The number of uncultivable cells was so adjusted to 100% (presented on the left); from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, (a) Impact of heat treatment on permeability for each specie reported to uncultivable cells. Percentage of permeabilized cells were presented with stripe and the ladder on the right, titled, horizontal and vertical stripe for *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, respectively (right axis). (b) Impact of heat treatment on enzymatic activity of each specie reported to uncultivable cells. Percentage of permeabilized cells were presented with stripe and the ladder on the right, titled, horizontal and vertical stripe for *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, respectively (right axis). Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates..... 125

Figure 42 : Impact of drying on the invasion in Caco-2 cells of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. Results of invasion after 1 h 30 are presented in log10(CFU) for a same inoculum of (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. “Control” represents the invasion of pure culture, “0.80” is directly after the inoculation of milk powder, “0.58” is directly after the drying until an a_W of 0.58 and “0.25” is directly after the drying until an a_W of 0.25. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates. Letters above bars represent the significant differences among conditions resulting of Tukey’s HSD test. 138

Figure 43 : Impact of drying on the cultivability of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. From darker to lighter, the results are presented for (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates. 139

Figure 44 : Impact of heating on the cultivability of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. From darker to lighter, the results are presented for (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates. 140

Figure 45 : Impact of heating in dried state on the invasion and multiplication in Caco-2 cells of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. Results of invasion after 1 h 30 are presented in $\log_{10}$(CFU) for a same inoculum of (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. Error bars represent

the standard deviation calculated on independent triplicates. Letters above bars represent the significant differences among conditions resulting of Tukey's HSD test. 141
Figure 46 : Effet de du séchage et de la réhydratation sur les bactéries Gram-négatives, schéma de résultats et d'hypothèse. 148

Table des tableaux

Tableau 1 : Persistance de *Cronobacter* spp. et de *Salmonella* spp. dans des produits alimentaires à faible activité de l'eau et dans des milieux modèles 11
Tableau 2 : Liste de TIAC associées à des produits alimentaires à faible activité de l'eau de 2000 à 2012 13
Tableau 3 : Différents produits alimentaires déshydratés rappelés ces cinq dernières années en Union Européenne et aux USA de 2010 à 2015 14
Tableau 4 : Critères microbiologiques concernant les deux pathogènes principaux des produits en poudre pour nourrisson (75) 16
Tableau 5 : Prévalence de *Cronobacter* spp. dans les PIF (74) 16
Tableau 6 : Résumé des TIAC chez les nourrissons dues à la consommation de PIF contaminée. 17
Tableau 7 : Répartition des sérotypes connus en 2007 en nombre dans le genre *Salmonella* spp. (91) 19
Tableau 8 : Les sept classes de HSP 34
Tableau 9 : Tableau présentant quelques valeurs de D et de z_T pour *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. dans des milieux aqueux et des milieux à faible activité de l'eau 51
Tableau 10 : Calculated time constants for weight loss τ and the initial drying rates for the loss of water weight (mg.min^{-1}) for each drying condition for PBS and milk substrates. 74
Tableau 11 : Comparison of supplementary time to detect bacterial population of species desiccated in PBS and milk submitted to different initial drying rates to reach an a_W of 0.90[1] 77
Tableau 12 : Comparison of supplementary time to detect bacterial population for bacteria desiccated in PBS and milk submitted to drying to reach different final a_W levels. 78
Tableau 13 : Effects of drying on the loss of cultivability and delay in growth recovery for both species in two substrates. 79
Tableau 14 : $D_{T,aw}$ values for four *Enterobacteriaceae* inactivated in milk powder at different water activities 102
Tableau 15 : z_T and y_{aw} values of four *Enterobacteriaceae* in whole milk powder at different temperatures and water activities determined by the Bigelow model. 107
Tableau 16 : Ensemble des $D_{90,0.25}$ pour les pathogènes étudiés et les traceurs biologiques potentiels. En rouge : les pathogènes étudiés. En vert : les traceurs biologiques sélectionnés en

fonction de leur profil d'inactivation dans de la poudre de lait à une activité de l'eau de 0.25 pendant un traitement thermique à 90°C..... 113

INTRODUCTION

L'évolution des industries agroalimentaires depuis une quarantaine d'années s'est faite par un fort développement de l'utilisation de produits alimentaires intermédiaires, en particulier les ingrédients secs (produits déshydratés, épices, céréales diverses…) dont la teneur en eau et l'activité de l'eau est réduite. Cette réduction de la quantité d'eau par séchage facilite ainsi leur transport, leur stockage ainsi que leur conservation à long terme, en préservant au mieux les propriétés organoleptiques et microbiologiques.

Des bactéries pathogènes peuvent être retrouvées sporadiquement dans ces aliments du fait de l'utilisation de matières premières contaminées et de la contamination apportée par la transformation du produit ou de son stockage. L'efficacité des techniques utilisées pour maîtriser le risque microbiologique est profondément liée aux propriétés physico-chimiques du produit alimentaire, notamment l'activité de l'eau, ainsi qu'à la nature et à l'état physiologique de la flore pathogène présente. En effet, la faible activité de l'eau des produits alimentaires déshydratés rend la plupart des germes présents plus résistants aux procédés de traitement thermique et donc difficile à éliminer. Devant ce constat, les industriels se sont organisés pour pasteuriser ou stériliser ces ingrédients déshydratés dans les pays producteurs, importateurs ou consommateurs avec différents types de technologies.

A l'heure actuelle, les produits alimentaires à forte activité de l'eau ou liquide sont pasteurisés ou stérilisés par l'intermédiaire de procédés thermiques. Ceux-ci sont composés d'une montée rapide à une température de consigne, maintenue pendant un temps défini garantissant l'inactivation des germes cibles. Les barèmes thermiques sont clairement définis à partir d'équations théoriques basées sur les transferts thermiques et les modèles d'inactivation microbienne en milieu liquide. Cependant, il n'existe actuellement aucun équivalent pour les produits secs qui sont décontaminés la plus part du temps de manière empirique en utilisant des procédés dont les principes peuvent être très différents.

Avec le renforcement de la sécurité microbiologique des aliments, le développement de modèles décrivant l'évolution des microorganismes a connu un grand essor durant les dernières décennies. Les modèles prédictifs développés sont toujours d'actualité en milieu liquide ou aqueux comme par exemple le modèle de Bigelow permettant de prédire la résistance des microorganismes en fonction de la température de traitement. La diversité actuelle des produits alimentaires et la diminution de l'intensité des traitements appliqués pour préserver leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles ont été accompagnées par le développement de modèles permettant de décrire plus précisément l'inactivation thermique des microorganismes. Parmi eux, certains prennent en compte d'autres facteurs que le temps et la température comme par exemple le pH (1), la salinité (2) ou encore la composition en acides gras (3).

Cependant, dans le cas des produits déshydratés, peu de modèles prennent en compte le rôle clé de l'activité de l'eau et une telle modélisation pourrait être fort utile pour assurer l'innocuité d'un aliment. De plus, depuis 2012, une loi adoptée aux Etats-Unis engendre peu à peu des changements dans toute l'industrie agroalimentaire, cette loi impose aux industriels produisant des aliments déshydratés de montrer explicitement l'efficacité de leur méthode de décontamination à l'aide de traceurs biologiques. Ces derniers doivent mimer le comportement d'un ou de plusieurs pathogènes cibles face à un traitement de décontamination et être utilisables *in situ* pour montrer que le procédé de décontamination mis en place est efficace. A côté de ce type d'évaluation empirique, des modèles d'inactivation microbiologique pourraient être utiles pour confirmer la fiabilité d'un traceur biologique et pour modifier rapidement les barèmes d'inactivation.

Ce travail est axé sur l'inactivation bactérienne par des procédés thermiques dans des produits alimentaires secs et à l'élaboration de modèles prédictifs de cette inactivation. L'impact du séchage, de la réhydratation puis des traitements thermiques sur l'inactivation bactérienne ont été étudiés. Les mécanismes cellulaires à l'origine de l'inactivation bactérienne ont été recherchés et finalement l'impact du séchage et des traitements thermiques sur la physiologie et la virulence de bactéries pathogènes, *Salmonella enterica* et *Cronobacter sakazakii*.

Le travail présenté dans ce mémoire s'articule en 5 parties :

- La première partie est consacrée à un état des lieux de la microbiologie des produits secs. Les méthodes classiques de séchage et décontamination sont présentées ainsi que leurs impacts sur la fonctionnalité bactérienne.
- Après avoir ciblé précisément les objectifs de ces travaux, il est montré comment le séchage peut être utilisé de manière innovante afin de réduire la charge microbienne lors de la fabrication des produits déshydratés.
- Dans la troisième partie, l'impact de la réhydratation, étape clé et toujours associée au séchage, sur l'inactivation bactérienne est étudié pour une meilleure évaluation de l'inactivation bactérienne lors de chaque étape.
- Puis, l'inactivation bactérienne dans des produits secs lors de différents traitements thermiques est étudiée. Un modèle prédictif est proposé en fonction de l'activité de l'eau du milieu et de la température du traitement.
- Finalement, l'impact du traitement thermique sur les cellules bactériennes déshydratées est étudié au travers de l'intégrité membranaire, de la perte d'activité enzymatique, et de la capacité d'invasion dans des cellules humaines.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les produits alimentaires déshydratés et leur lien avec la sécurité microbiologique

1.1. Les produits alimentaires secs

Historiquement, les produits à faible activité de l'eau et à faible teneur en eau ont été produits et/ou transformés par l'Homme afin de permettre leur préservation à long terme en évitant le développement de pathogènes alimentaires (4). Aussi appelés produits secs (PS), ils représentent un grand nombre de produits comme les graines, les herbes aromatiques, les épices, la farine…

Dans ces PS, la faible quantité d'eau restante est liée à d'autres molécules (protéines, ions, …) et par conséquent, n'est pas disponible pour des réactions chimiques ou pour les microorganismes, ce qui peut limiter leur développement (4).

Le control de la teneur en eau d'un produit alimentaire par le séchage pour permettre sa conservation est donc une stratégie ancienne (5). La relation entre la teneur en eau et l'humidité relative à une certaine température est établie en 1893 pour des fibres textiles. Finalement, les premières études faisant le lien entre la croissance microbienne et l'humidité relative ont été réalisées par Walderdorff and Walter dans les années 1920. Par la suite, en 1953, le concept d'activité de l'eau pour un échantillon alimentaire a été défini par un microbiologiste australien W.J Scott qui établit le lien entre la croissance microbienne et l'activité de l'eau.

L'activité de l'eau est définie comme étant le rapport de la pression partielle en vapeur d'eau du produit testé et la pression partielle de vapeur d'eau saturante à la même température (**Equation 1**).

$$a_W = \frac{p}{p^*} \quad (1)$$

avec p, la pression partielle de vapeur d'eau présente dans le produit ou l'atmosphère et p^*, la pression partielle de vapeur d'eau saturante dans les mêmes conditions de pression et de température.

L'activité de l'eau varie entre 0 et 1 ; l'eau pure à pression atmosphérique a une activité de l'eau égale à 1. Les produits alimentaires ont tous une activité de l'eau inférieure à 1 (4).

L'activité de l'eau est liée également à d'autres grandeurs thermodynamiques comme la température. En effet, la température change l'activité de l'eau en impactant la rétention de l'eau, la dissociation de l'eau, la solubilité des solutés dans l'eau ou encore en impactant sur d'autre composant de l'échantillon. L'impact de la température sur l'activité de l'eau d'un produit est

donc spécifique à ce produit. Certains aliments ont une activité de l'eau qui augmente avec l'augmentation de la température et d'autres ont une activité de l'eau qui diminue avec l'augmentation de la température. Par conséquent, il est difficile de prédire dans quelle direction vont se produire les changements d'activité de l'eau d'un produit avec les changements de température. Cette dépendance de l'activité de l'eau par rapport à la température suit la relation de Clausius-Clapeyron (**Equation 2**) :

$$\ln\left(\frac{a_{W2}}{a_{W1}}\right) = -\frac{\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \quad (2)$$

où a_{W1} et a_{W2} (-) sont les activités de l'eau aux températures T_1 et T_2 (K). ΔH (J.mol^{-1}) est l'enthalpie de vaporisation et R (J.K^{-1}.mol^{-1}) est la constante des gaz parfaits.

De nombreuses études ont eu pour but de montrer l'importance de l'activité de l'eau ainsi que sa compréhension et ses applications possibles (6). L'activité de l'eau est très couramment utilisée pour prédire la stabilité des propriétés microbiologiques et organoleptiques des produits alimentaires. En effet, une réduction faible de l'a_W, en dessous de 0,97, permet d'éviter le développement de microorganismes contaminants tels que *Pseudomonas* spp. et, en dessous de 0,95, le développement de certaines bactéries lactiques altérant les propriétés organoleptiques des produits alimentaires est arrêté. Cependant, une réduction plus importante de l'a_W est nécessaire pour assurer l'inhibition de certaines bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* étant le plus résistant) en dessous de 0,86 (**Figure 1**) en aérobie et en dessous de 0,91 en anaérobie.

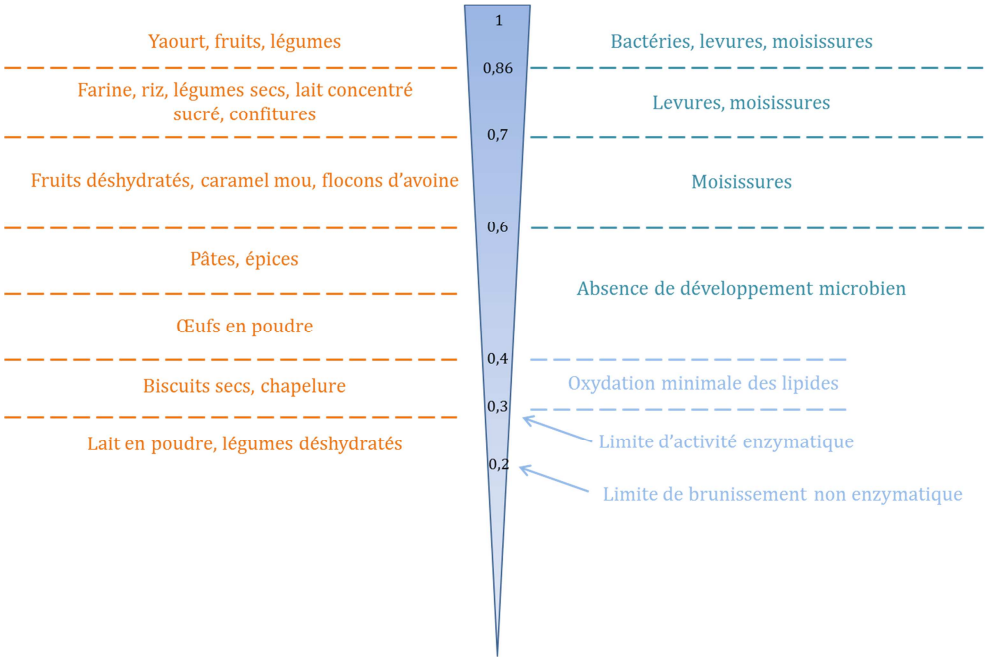

Figure 1 : Développement des microorganismes, limites des réactions biochimiques en fonction de l'aw et produits alimentaires correspondants

En dessous de ce niveau, aucune bactérie pathogène pour l'homme ne peut se multiplier, seules certaines levures ou champignons filamenteux peuvent se développer jusqu'à environ une a_w d'environ 0,60. En dessous de cette limite, le développement des microorganismes est complètement arrêté comme schématisé en **Figure 1** (7). Il est également possible de noter que l'activité de l'eau modifie d'autres propriétés du produit comme l'oxydation des lipides (minimale entre 0,3-0,4) ou encore le brunissement non enzymatique et l'activité enzymatique.

Les PS sont caractérisés par une activité de l'eau inférieure à 0,60, permettant ainsi de prévenir le développement des microorganismes (4). L'activité de l'eau peut être modifiée par des procédés tels que le séchage ainsi que par addition de sels ou de sucres (7). Ces produits regroupent un grand nombre de produits alimentaires, comme les céréales, le chocolat, la poudre de cacao, les fruits secs, les légumes secs, la poudre d'œufs, la farine, les herbes aromatiques, les épices, le miel, la poudre de protéines végétales hydrolysées, la poudre de viande, la poudre de lait, les pâtes, le beurre de cacahuète, les fruits à coques, les poudres pour nourrissons ou encore les graines (**Figure 1**) (8).

La plupart de ces produits ne sont pas consommés ou utilisés tels quels par les consommateurs mais sont à nouveau introduits dans les chaines de productions alimentaires. Ils rentrent ainsi dans la formulation d'autres produits élaborés en étant réhydratés et se retrouvent dans un produit fini, pouvant lui aussi être déshydraté. De plus, l'état sec permet également d'en faciliter la manutention, le stockage et le transport (9). Ceci fait des poudres un élément clé de l'industrie agroalimentaire (en rouge sur la **Figure 2**).

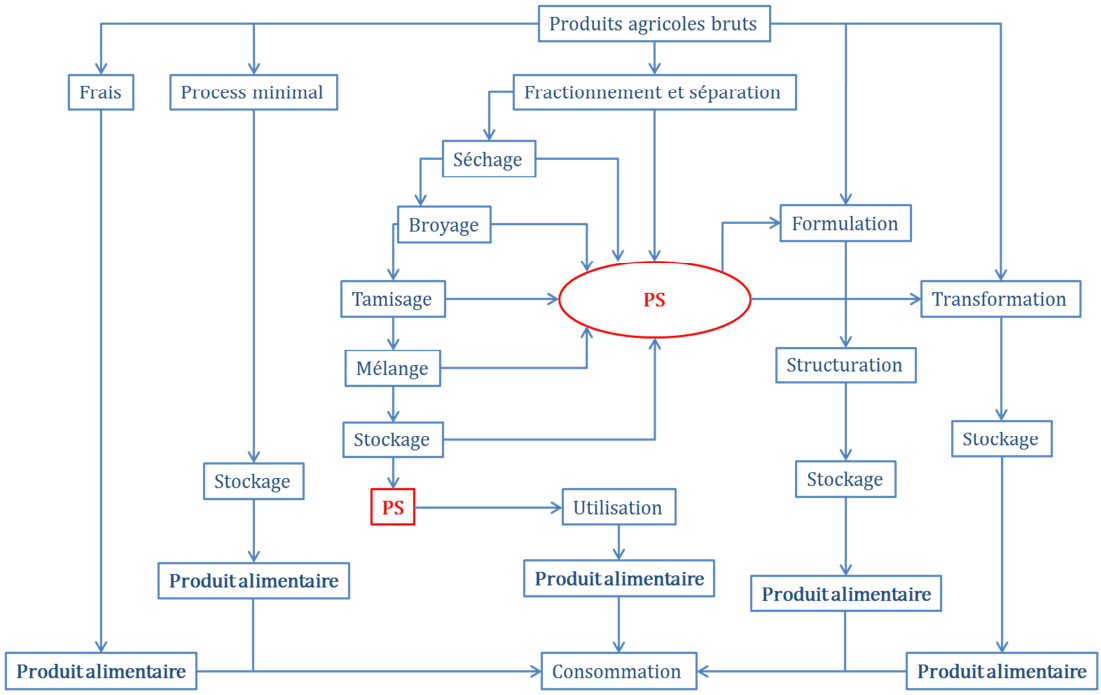

Figure 2 : Les produits alimentaires secs au cœur de l'industrie agro-alimentaire, d'après Cuq et al. 2011 (10)

Par leur position centrale au sein de l'industrie agroalimentaire, il est clair que la qualité microbiologique de ce type de produits soit cruciale.

1.2.Origines de la contamination des produits secs

La contamination des PS dépend de l'historique et de l'utilisation de ces produits. La contamination des produits alimentaires secs est par conséquent possible tout au long de la chaine alimentaire (4) (**Figure 3**).

Le type de population microbienne rencontrée sur les produits tels que les noix, les graines, les herbes aromatiques ou encore les épices est largement influencé par la diversité des flores microbiennes du sol et de la plante. Par exemple, la production de gingembre impose obligatoirement un contact avec le sol, la partie consommée étant souterraine. Il est possible de citer également les contaminations de céréales par de nombreuses bactéries ou champignons lors de la culture en champs (4, 11). Bien que la terre (ou résidu de substrat de culture) soit retiré en grande partie des produits bruts, il est possible que cela contamine les surfaces, notamment dans les zones de stockage des produits ou des lignes de production (8, 11).

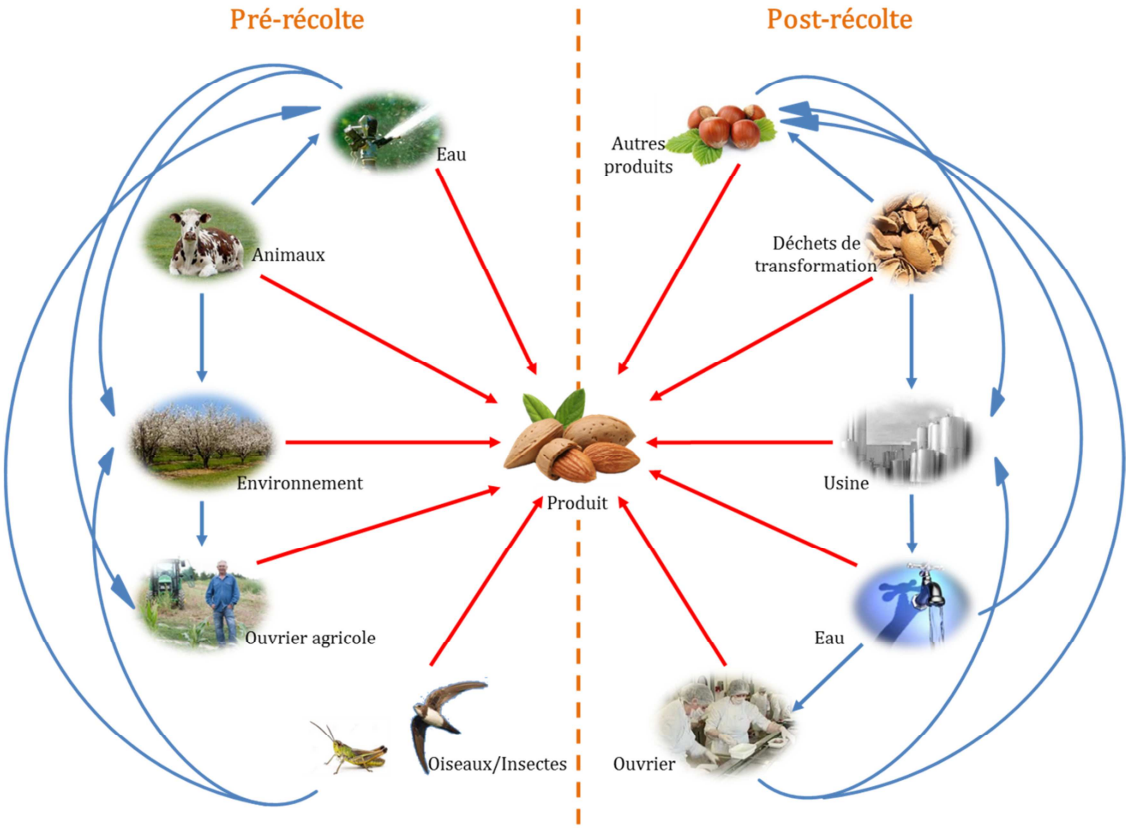

Figure 3 : Voies majoritaires de la contamination pré et post-récolte des PS. En rouge : les voies de contamination directes. En bleu : les voies de contamination indirectes

L'eau, utilisée dans les procédés agricoles et alimentaires, est une source majeure de la contamination microbienne des installations au sein de l'entreprise mais aussi des produits

alimentaires eux-mêmes. Par exemple, il est possible que les procédés agricoles tels que l'irrigation puisse transporter des microorganismes d'un sol plus chargé microbiologiquement à un autre. Par conséquent le type d'irrigation à un impact fort sur la charge microbienne du produit. De plus, l'eau est aussi utilisée en post-récolte pour laver les produits, présentant ainsi un risque de contamination supplémentaire surtout si l'eau souillée reste stagnante, favorisant ainsi la prolifération des microorganismes (8, 11).

De même, lors de la préparation de certains produits alimentaires, tels que les noix ou les amandes, les coques sont retirées et de nombreux aérosols (poussières, …) potentiellement porteurs de pathogènes sont produits. Ils sont difficiles à éliminer complètement de l'environnement de production et peuvent conduire à un phénomène de la contamination croisée des lots, c'est-à-dire qu'un lot contaminé en contamine un autre par l'intermédiaire des aérosols (11).

Les animaux, comme les oiseaux, les rongeurs ou encore les insectes peuvent aussi être des vecteurs de contamination des PS. Ils sont tous connus pour être largement porteurs des microorganismes pathogènes et sont présents à proximité des exploitations agricoles. Les conditions d'hygiène sont importantes en industrie pour éviter leur présence (11). Dans d'autres cas, la manutention des produits par l'homme est inévitable et devient également source de contamination des produits.

Toutes ces informations soulignent l'importance d'un traitement de décontamination des PS après récolte et transformation.

Parmi l'ensemble des foyers de maladies impliquant les PS entre 2007 et 2012, 63% d'entre eux concernaient des produits ayant reçu un traitement de stérilisation. La plupart des contaminations pré et post décontamination des PS est surtout due au phénomène de contamination croisée sensiblement similaires à celles observées avant traitement (11, 12). Il est clair que les voies de contamination par des bactéries pathogènes, dont *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp., sont diverses et doivent être maitrisées par une validation du procédé de décontamination mais également de tout l'environnement post-traitement.

Globalement, de nombreuses sources de contaminations sont envisageables lors de la production des PS. Une fois sur le produit alimentaire, les bactéries pathogènes peuvent persister à l'état sec pendant de longues périodes.

1.3.Persistance des bactéries dans les produits secs

Les microorganismes ont besoin d'eau disponible pour se développer et se multiplier (13). C'est une des raisons pour laquelle le fait de diminuer l'activité de l'eau est un moyen efficace pour préserver les qualités microbiologiques des produits en empêchant le développement de flores

pathogènes et/ou d'altération. Cependant, même si elles ne peuvent se développer, elles peuvent survivre à l'état sec et être préservées dans un état métabolique de dormance pendant de longues périodes.

La persistance bactérienne peut se définir comme étant « la capacité d'isoler de façon répétable un type moléculaire ou une souche spécifique dans la même entreprise pendant une période de temps étendue ; typiquement des mois ou des années » (12). Pour les pathogènes, cette capacité n'est pas surprenante au vu des environnements dans lesquels elles peuvent se retrouver au cours de leur cycle de vie (**Figure 4**). Les perturbations environnementales rencontrées au cours du cycle de vie sont aussi souvent appelées « stress » et les causes peuvent en être diverses, et sont présentées en rouge sur la **Figure 4** lors de l'arrivée dans un nouveau réservoir (oxydation, séchage, augmentation ou diminution de la température, acidification…) (14–16).

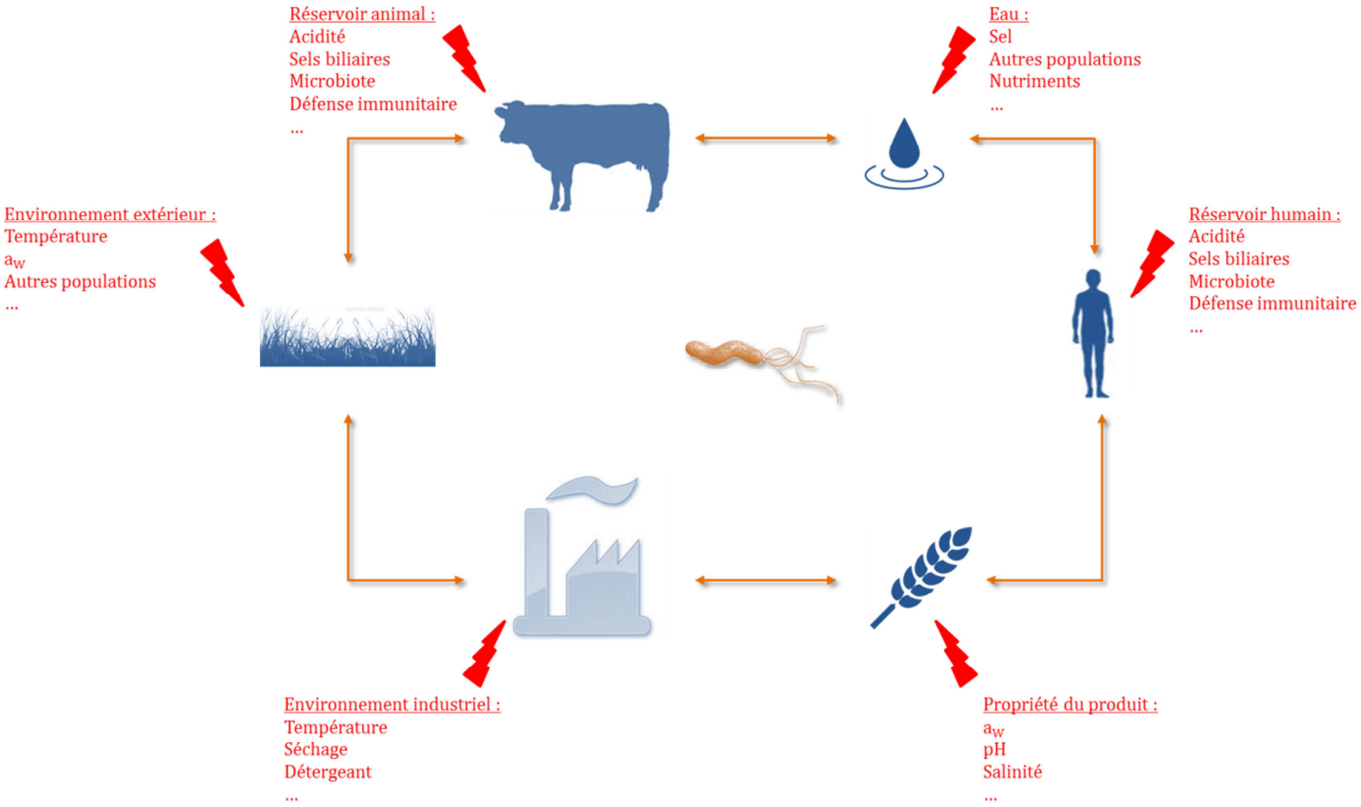

Figure 4 : Différents stress environnementaux possiblement rencontrés par *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. au cours de leur cycle de vie

De nombreuses études se sont focalisées sur la survie de *Salmonella* spp. et de *Cronobacter* spp. dans les environnements à faible activité de l'eau (17–24). D'autres paramètres sont souvent combinés à l'activité de l'eau comme la température de stockage ou encore l'absence et la présence de lumière. Le **Tableau 1** montre l'influence de l'activité de l'eau et de la température de stockage sur la persistance de *Cronobacter* spp. et de *Salmonella* spp., deux pathogènes de l'industrie agroalimentaire, à travers quelques exemples.

Il est possible de noter que la période de persistance est longue et s'étale sur des mois voire sur des périodes dépassant un an, comme pour *Cronobacter* spp. capable de survivre plus de 30 mois dans les préparations en poudre pour nourrissons (PIF, Powdered Infant Formula).

De plus, à la vue du **Tableau 1**, il est clair que la température de stockage du produit impacte la survie des pathogènes, avec une diminution de la survie quand la température de stockage augmente.

Tableau 1 : Persistance de *Cronobacter* spp. et de *Salmonella* spp. dans des produits alimentaires à faible activité de l'eau et dans des milieux modèles

Microorganismes	Produits alimentaires et milieux modèles	aw	Log initial	Log final	Réduction	Durée	Température	Référence
Cronobacter spp.	Riz pour nourrisson	0,30, 0,46, 0,69	0,31	présence		12 mois	4, 21 et 30°C	(25)
		0,3	5	4,5	0,5	12 mois	4°C	
		0,3	5	2,5	2,5	12 mois	21°C	
		0,3	5	0,25	4,75	9 mois	30°C	
		0,45	5	4	1	12 mois	4°C	
		0,45	5	2	3	6 mois	21°C	
		0,45	5	0,25	4,75	3 mois	30°C	
		0,68	5	3,5	1,5	12 mois	4°C	
		0,68	5	0,25	4,75	9 mois	21°C	
		0,68	5	0,25	4,75	6 mois	30°C	
	PIF	0,27	6	2,5	3,5	23 mois	Ambiante	(26)
	PIF	NP	11	présence		30 mois	Ambiante	(8)
	PIF	NP	9	5,5	3,5	3 mois	30°C	(27)
	TSB	NP	9	7,75	1,25	3 mois	30°C	
	PBS	~0,2	9	8	1	23 mois	25°C	(26)
		~0,2	9	7	2	23 mois	45°C	
S. Enteritidis	PBS	~0,2	9	7,5	1,5	23 mois	25°C	(26)
	Noix	NP (Humidité <8%)	9,5	9	0,5	4 mois	4°C	(28)
		NP (Humidité <8%)	9,5	7	2,5	4 mois	Ambiante	
S. Senftenberg	PBS	~0,2	9	7	2	23 mois	25°C	(26)
S. Typhimurium	Beurre de cacahuète	NP	8,51	5,35	3,16	2 mois	Ambiante	(29)
Salmonella enterica	Beurre de cacahuète standard	0,4	8	7,75	0,25	1 mois	4°C	(30)
		0,4	8	7,5	0,5	1 mois	25°C	
	Beurre de cacahuète bio	0,4	8	7,6	0,4	1 mois	4°C	
		0,4	8	0,7	7,3	1 mois	25°C	
	Amande	[0,3-0,5]	4	1	3	12 mois	24°C	(31)
		[0,4-0,6]	4	4	0	12 mois	4°C	
	Pistache entière	[0,3-0,5]	5	3	2	12 mois	24°C	
		[0,4-0,6]	5	5	0	12 mois	4°C	
	Tahini	0,17	5,6	2,6	3	4 mois	4°C	(32)
		0,17	5,6	1	4,6	4 mois	22°C	
	Noix de pécan	0,4	6	6	0	19 mois	4°C	(33)
		0,4	6	3	3	19 mois	21°C	
		0,4	6	2	4	19 mois	37°C	

PIF : Powdered Infant Formula, Préparation en poudre pour nourrissons

Ainsi, non seulement les bactéries peuvent résister à la déshydratation et persistent dans les PS, mais elles peuvent également y survivre pendant de longues périodes. Cette persistance peut notamment s'expliquer par plusieurs phénomènes qui ont lieu lors du passage à l'état sec des microorganismes.

1.4.Epidémiologie des produits alimentaires secs

1.4.1. Toxi-infections alimentaires

Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) correspondent à l'apparition de deux cas infectieux groupés dont la cause est d'origine alimentaire. Toute TIAC est à déclaration obligatoire au sein de l'autorité compétente dans le pays touché, en France il s'agit de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). Cette déclaration s'effectue par le médecin ou le biologiste constatant la maladie ou encore par les occupants du foyer.

La déclaration obligatoire permet à la santé publique d'effectuer une enquête épidémiologique permettant d'identifier le produit alimentaire incriminé. Ensuite, des mesures sont présentées pour éviter d'éventuelles récidives. Une synthèse des TIAC est réalisée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) après mise en commun de toutes les données (34).

En France, certains agents infectieux sont sous surveillance épidémiologique par les Centres Nationals de Référence (CNR). Il en existe onze veillant sur respectivement *Salmonella*, les bactéries anaérobies et le botulisme, *Campylobacter* spp. et *Helicobacter* spp., les virus entériques, *Escherichia coli* et *Shigella* spp., *Listeria* spp., *Trichinella* spp., les staphylocoques, *Brucella* spp. et *Franscisella tularensis* et finalement les hépatites A et E (34). Le nombre de TIAC déclaré par an en France est en augmentation même si l'aliment incriminé n'est testé positif que dans 47% des cas. La contamination par un agent infectieux à lieu à 70% dans les restaurations collectives et les foyers par ingestion d'aliments contaminés (34). De nombreux pathogènes alimentaires peuvent survivre dans les PS pendant des longues périodes et de nombreuses TIAC impliquent des produits alimentaires déshydratés, comme présenté dans le **Tableau 2** pour une période comprise entre 2000 et 2012. Sur cette période, 59 TIAC ont été recensées (**Tableau 2**) dont 39 TIAC impliquant *Salmonella enterica*, soit 66% des foyers de TIAC dus à cette bactérie. Deux bactéries sporulées sont également impliquées, *Bacillus cereus* et *Clostridium* spp. avec 12% et 5% des TIAC. Les STEC (Sighella Toxin *Escherichia coli*) sont également retrouvées pour 10% des TIAC. Finalement, de façon minoritaire, *Staphylococcus* spp. et *Cronobacter* spp. sont retrouvés à 5% et 2%.

Ainsi, *Salmonella enterica* est la bactérie la plus impliquée dans les TIAC engageant les produits alimentaires secs. *Cronobacter* spp. est faiblement impliquée dans les TIAC mais de par sa forte résistance aux procédés de décontamination, il représente un challenge pour l'industrie agroalimentaire.

Tableau 2 : Liste de TIAC associées à des produits alimentaires à faible activité de l'eau de 2000 à 2012.

Année	Microorganismes	Produit alimentaire	Nombre de cas	Hospitalisations (décès)	Pays	Références
2000	*S.* Enteritidis	Amandes	168		USA, canada	(35)
2001	*S.* Oranienburg	Chocolat	439		EU	(36)
	S. Typhimurium	Halva	70		EU	(37–39)
	S. Stanley, *S.* Newport	Cacahuètes	109		Australie, Canada, USA	(40)
	Cronobacter spp.	Formulation pour nourrisson	11		USA	(41)
2002	*S.* Montevideo	Tahini	68		Australie, Nouvelle Zélande	(42)
	S. Braenderup	Curry	20	1 (0)	UK	(43)
2003	*S.* Enteritidis	Amandes	29		USA, canada	(44)
	S. Agona	Thé	42	21 (0)	Allemagne	(45)
2004	*S. aureus*	Poudre de lait	150		Chine	(8)
2005	*S.* Enteritidis	Amandes	15		Suède	(46)
	S. Typhimurium	Préparation pour gâteau	26		USA	(47)
2006	*S.* Tennessee	Beurre de cacahuète	628		USA	(48)
2007	*B. cereus*	Riz, graines, amandes, noisettes	62		EU	(49)
	E. coli STEC	Riz, graines, amandes, noisettes	45		EU	(49)
	Salmonella spp.	Riz, graines, amandes, noisettes	34		EU	(49)
	S. aureus	Riz, graines, amandes, noisettes	26		EU	(49)
	Staphylococcus spp.	Riz, graines, amandes, noisettes	120		EU	(49)
	S. Weltevreden	Graines de luzerne	25		Scandinavie	(50)
	B. cereus	Riz soufflé	8		USA	(51)
	S. Schwarzengrund	Pet food	62		USA	(51)
	Salmonella spp.	Chocolat et sucreries	242		EU	(52)
	Salmonella spp.	Riz impérial	27		USA	(51)
	S. Tennessee	Beurre de cacahuète	425		USA	(51)
	S. Wandsworth	Snack à base de riz et de blé	75		USA	(53)
	S. Wandsworth	Mixe d'assaisonnement	69	6 (0)	USA	(54)
	S. Typhimurium	Mixe d'assaisonnement	18	2 (0)	USA	(54)
	B. cereus	Mélange d'épice pour couscous	146	0	France	(43)
	S. Senftenberg	Graine de fenouille	14	4	Serbie	(55)
2008	*Salmonella* spp.	Riz, graines, amandes, noisettes	2		EU	(52)
	S. Rissen	Poivre blanc moulu	87	22 (1)	USA	(43)
	B. cereus	Riz	10		USA	(11)
	C. perfringens	Riz espagnol	2		USA	(56)
	S. Kedougou	Aliment pour nourrissons	42		Espagne	(57)
	S. Agona	Riz soufflé	28		USA	(58)
	S. Enteritidis	Riz	82		USA	(11)
	Salmonella spp.	Chocolat et sucreries	4		EU	(52)
	Salmonella spp.	Aliment pour nourrissons	8		France	(59)
	S. Typhimurium	Beurre de cacahuète	714		USA	(60, 61)
	C. botulinum	Beurre de cacahuète	5		Canada	(62)
	S. Give	Formulation pour nourrisson	8		France	(63)
2009	*E. coli* O157:H7	Pate à cookies crue	76		USA	(64)
	B. cereus	Riz	28		USA	(11)
	S. Montevideo	Pistaches grillées			USA	(11)
	S. Enteritidis	Riz soufflé	11		USA	(11)
	S. Senftenberg	Poivre noir	11		USA	(65)
2010	*S.* Montevideo	Poivre noir	272	52 (0)	USA	(65)
	B. cereus	Riz	131		USA	(11)
	C. botulinum	Tofu séché			Taiwan	(11)
	B. cereus	Poivre blanc	112	0	Danemark	(43)
2011	*E. coli* O104:H4	Graines de fenouille	4321		Allemagne	(66)
	E. coli O157:H7	Noix	11		Canada	(11)
	E. coli O157:H7	Noisettes	8		USA	(67)
	S. Enteritidis	Pignons de pin	43		USA	(68)
2012	*S.* Bredeney	Beurre de cacahuète	42		USA	(69)
	S. Infantis	Pet food	49		USA	(70)
	S. Oranienburg	Poudre de lait	16		Russie	(71)

Globalement, les TIAC impliquant les PS ont une incidence constante dans le temps avec de nombreux foyers à travers le monde. De par la propriété des PS développée précédemment, ils peuvent être la source de contaminations de nombreux autres produits et ainsi ne pas être identifiés comme « source » de TIAC (4).

En plus des cas de TIAC à travers le monde, les produits alimentaires font régulièrement l'objet de rappel de produits alimentaires. En effet, les maitrises des dangers et les autocontrôles présents au quotidien dans les industries agro-alimentaires font que la qualité microbiologique des produits est de plus en plus maitrisée mais le risque zéro n'existe pas. Il est possible de rencontrer des problèmes sanitaires avant déclaration de TIAC. Quand un danger pour le consommateur a été identifié, l'entreprise identifiant le problème ou les autorités sanitaires effectuent un rappel du produit alimentaire en question à l'échelle nationale ou internationale représentant un impact financier lourd pour les industries agroalimentaires (72).

1.4.2. Historique des rappels de produits contaminés

En France, la liste des produits ayant fait l'objet d'un rappel est disponible sur le site internet de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF).

Tout comme les autres produits alimentaires, les PS font l'objet de rappels réguliers. Le **Tableau 3** recense le nombre de produits alimentaires déshydratés rappelés en France et aux USA depuis 2007.

Tableau 3 : Différents produits alimentaires déshydratés rappelés ces cinq dernières années en Union Européenne et aux USA de 2010 à 2015

Année	Microorganismes	Produits alimentaires rappelés	Pays	Références
2010	*Salmonella* spp.	Ail en poudre, Bretzels, Chips, Croustilles de maïs, Dip mix, Epices, Farine de soja, Frites, Frites gout barbecue, Graine de sésame, Graines de poivre, Mélange de pâtes, Mélange de snack, Mélange d'oignons, Mélange pour sauce, Mélange pour soupe, Mélanges à gâteau, Mélanges contenant des bretzels, Mixe d'assaisonnements, Mixe d'assaisonnements salés, Noix, Noix de muscade, Noix non décortiquées, Nouilles aux œufs, Peet food, Pistaches, Pistaches entières, Poivre noir	USA	(73)
	L. monocytogenes	Beurre de cacahuète et autre	USA	
2011	*E. coli* O157:H7	Mélange de fruit à coque	USA	(73)
	Salmonella spp.	Beurre de cacahuète, Farine de soja et produit à base de soja, Graines de céleri bio, Pet food, Pignon de pin, Poudre de protéine, Poudre pour chili, Thé bio à la menthe poivrée	USA	
2012	*E. coli* O157:H7	Graines de caco bio	USA	(73)
	L. monocytogenes	Pop corn	USA	
	Salmonella spp.	Crackers, Formulation à base de prébiotiques en poudre, Pet food, Poivron rouge	USA	
2013	*Salmonella* spp.	Mélange pour gâteau, Origan en poudre, Pet food, Pistache, Pistache grillée, Tahini	USA	(73)
	L. monocytogenes	Graines de tournesol	USA	
2014	*Salmonella* spp.	Beurre de noix, Divers produits de snack, Farine de blé complet, Graine de chia, Graines de poivre noir, Noix de macadamia, Noix et noisette pour cookies, Origan en poudre, Pet food, Poudre de caroube, Poudre de protéines, Poudre pour chili, Roucou haché	USA	(73)
2015	*Salmonella* spp.	Ail en poudre, Assaisonnement, Coriandre en poudre bio, Différents produits à base de poudre d'ail, Farine, Flocon d'avoine bio, Graines de lin moulues, Mélange de fruit à coque, Mélange de graines, Noix, Noix de cajou, Noix de coco, Noix de macadamia, Noix hachée, Pet food, Pignon de pin	USA	(73)
	Salmonella spp.	Gingembre moulu	France	
	L. monocytogenes	Pet food	USA	(73)
	Toxine de *S. aureus*	Poudre de protéine	USA	(73)

Il ressort de ce tableau que le nombre de rappels de produits est supérieur au nombre de TIAC recensées (voir **Tableau 2**) montrant un système efficace de détection des pathogènes alimentaires. Cependant, le nombre de rappels de produits est considérable avec plus de 91 types de produits. La première bactérie contaminante est *Salmonella* spp., représentant 84 produits rappelés sur les 91 de 2010 à 2015, soit 92% des produits (**Tableau 3**). Les autres causes de rappel sont *L. monocytogenes*, *E. coli* STEC ou encore les produits contaminés avec des toxines de *S. aureus*. Une fois rappelés, les produits alimentaires sont détruits. Par conséquent, cela représente une perte économique importante pour les entreprises ainsi qu'un gaspillage de produits alimentaires.

Parmi les PS, certains sont destinées à l'alimentation infantile et soumis à une réglementation particulière.

1.4.3. Le cas des produits alimentaires pour nourrissons

L'alimentation pour nourrissons représente une gamme particulière des PS. La sécurité des aliments est d'autant plus importante que cette partie de la population est hautement vulnérable face aux infections, de par leur système immunitaire et leur flore intestinale en développement (74). Par exemple, il est connu que la salmonellose, maladie causée par *Salmonella* spp., touche plus fortement les populations de 0 à 4 ans, la tranche d'âge la moins touchée étant les personnes âgées de 25 à 44 ans comme le montre la **Figure 5**.

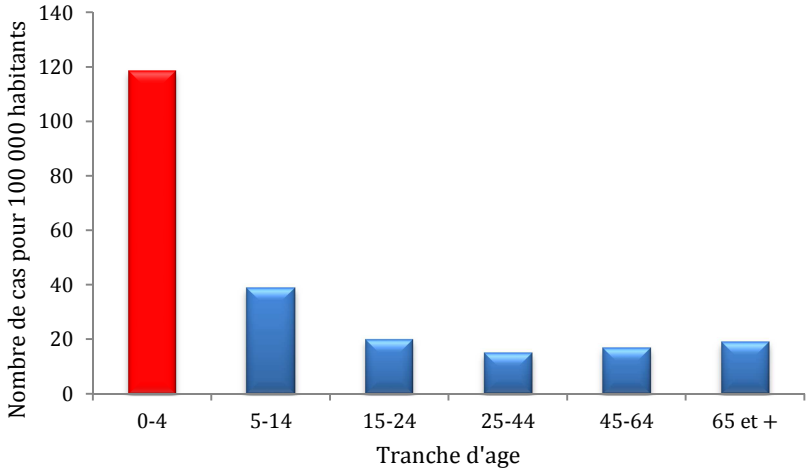

Figure 5 : Distribution du nombre de cas de salmonellose pour 100 000 habitants en fonction de l'âge de la population pour l'Union Européenne en 2008 (52)

Pendant les premiers mois, les nourrissons sont nourris au lait maternel, au lait infantile ou encore aux préparations en poudre pour nourrisson (Powdered Infant Formula, PIF) à base de lait (74). Ces types de produits ne sont, en général, pas stériles et leur niveau de contamination est établi par le *Codex Alimentarius* (74).

De 2004 à 2006, un travail commun entre la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) et l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) a permis de montrer que plusieurs bactéries pouvaient être isolées des produits en poudre pour nourrissons en lien avec des infections chez les très jeunes enfants. Les deux grands pathogènes d'intérêt sont *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp.. Finalement, les critères microbiologiques ont été révisés en 2008 concernant ces produits suite à la prise de conscience de l'importance des infections néonatales à *Cronobacter* spp.. Ces critères sont présentés dans le **Tableau 4** dans lequel il ressort que ces deux bactéries doivent être absentes des PIF (74, 75).

Tableau 4 : Critères microbiologiques concernant les deux pathogènes principaux des produits en poudre pour nourrisson (75)

Microorganismes	Nombre d'échantillons	Nombre maximal d'échantillon défectueux autorisés	Echantillon	Limite de bactéries détectées autorisées
Salmonella enterica	60	0	25g	0
Cronobacter spp.	30	0	10g	0

Cette norme « absence/présence » nécessite la vérification de l'innocuité par une méthode d'échantillonnage adaptée permettant de ne pas passer à côté de la contamination bactérienne. Cependant, plusieurs études effectuées dans différents pays révèlent que la contamination à *Cronobacter* spp. n'est pas complètement maitrisée (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Prévalence de *Cronobacter* spp. dans les PIF (74)

Pays	Prévalence[a]	Prévalence (%)	Niveau de contamination
Bangladesh	1/32	3	ND
Brésil	12/42	29	0,54 MPN/100g[b]
Indonésie	10/74	14	ND
Jordanie	1/69	1	ND
Japon	4/61	7	0,36 MPN/100g
Corée	4/75	5	3,6-23 UFC/100g[c]
Corée	7/102	7	ND
Nigéria	20/70	29	ND
Royaume-Uni	2/82	2	ND

a. Nombre d'échantillons positifs sur nombre d'échantillons totaux
b. MPN : Most Probable Number, quand les analyses sont effectuées à l'aide de méthodes de biologie moléculaire
c. UFC : Unité Formant Colonie, quand les analyses sont effectuées à l'aide de méthodes classiques de microbiologie

En effet, dans les pays présentés dans le tableau précédent, il ressort que la présence de *Cronobacter* spp. peut constituer 30% des échantillons testés donc présentant un risque pour les nourrissons. Si l'on recense, parmi les TIAC impliquant les produits alimentaires déshydratés, les TIAC chez les nourrissons, le **Tableau 6** peut être dressé.

Tableau 6 : Résumé des TIAC chez les nourrissons dues à la consommation de PIF contaminée

Année	Produit	Pathogène	Nombre de cas	Pays	Références
1973	Poudre de lait	*S.* Derby	3000	Trinidad	(76)
1985	Poudre de lait	*S.* Ealing	76	Royaume Uni	(77)
1986	PIF	*Cronobacter* spp.	3	Islande	(78)
1988	PIF	*Cronobacter* spp.	4	USA	(74)
1993	PIF	*S.* Tennessee	>3	Canada, USA	(79)
1995	Céréales pour nourrissons	*S.* Senftenberg	5	Royaume Uni	(80)
1996	PIF	*S.* Virchow	>48	Espagne	(81)
	PIF	*S.* Antanum	17	Royaume Uni, France	(82)
1998	PIF	*Cronobacter* spp.	12	Belgique	(83)
2000	PIF	*S.* London	31	Corée	(84)
2001	PIF	*Cronobacter sakazakii*	11	USA	(83)
2004	PIF	*Cronobacter* spp.	9	France	(85)
	PIF	*S.* Agona	141	France	(74)
	Poudre de lait	*S.* aureus	150	Chine	(8)
2008	PIF	*S.* Give	8	France	(63)
	PIF	*S.* Kedougou	42	Espagne	(57)
2012	Lait en poudre	*S.* Oranienburg	16	Russie	(71)

Il ressort de ce tableau que parmi ces TIAC, *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp. sont particulièrement incriminés.

Certaines TIAC peuvent toucher de nombreux nourrissons comme par exemple en 2004 avec 141 cas de salmonellose en France dus à la consommation de préparations en poudre pour nourrissons. Ainsi, les TIAC persistent malgré la tolérance zéro des autorités sanitaires, certainement à cause des méthodes de détection de *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp..

L'ensemble de ces données permet de concevoir aisément le rôle clé des produits alimentaires déshydratés dans la chaine alimentaire mais également de constater qu'ils peuvent présenter un risque pour le consommateur. En effet, des bactéries potentiellement pathogènes, telles que *Cronobacter* spp., peuvent persister des mois voire des années sur des produits à faible a_W. C'est notamment pour cette raison que les produits secs sont régulièrement impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives. Ils peuvent être porteurs de *Salmonella enterica* impliquée dans plus des deux tiers des cas de toxi-infections alimentaires qui ont eu lieu entre 2000 et 2012. Parmi les produits secs, un cas particulier ressort, les produits alimentaires pour nourrissons. Pour envisager d'éliminer ces bactéries des produits alimentaires à faible a_W, il est nécessaire d'avoir des connaissances sur leurs mécanismes d'acclimatation à la déshydratation ainsi que leur impact sur la physiologie bactérienne. Il est également possible de se demander si cette acclimatation à l'état sec peut influer sur leur virulence et sur leur résistance ultérieure à des procédés thermiques de décontamination.

2. *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp., deux bactéries contaminantes des produits secs

2.1. *Salmonella enterica* et *Cronobacter sakazakii*

2.1.1. *Salmonella enterica*, bactérie pathogène courante de l'industrie agroalimentaire

Parmi les pathogènes retrouvés dans les TIAC impliquant les produits secs, *S. enterica* a la plus grande incidence en Europe. Bien que les cas de salmonellose diminuent chaque année, elle est impliquée dans plus de 100 000 cas en Europe par an, tous produits alimentaires confondus, et est la deuxième bactérie impliquée dans les TIAC après *Campylobacter* spp. (52). A travers le monde, 93,8 millions de cas sont rapportés chaque année et le nombre de décès est de 155 000 par an (86).

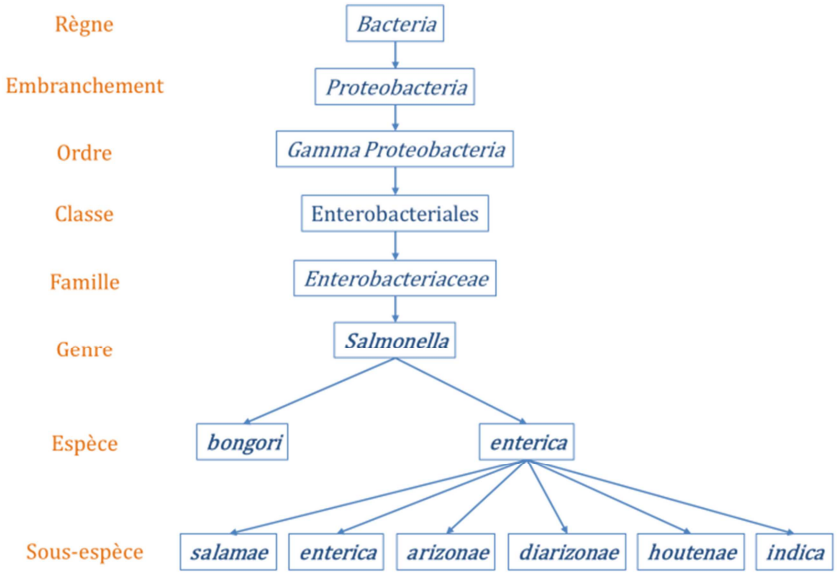

Figure 6 : Représentation schématique de la position du genre *Salmonella* spp. et de sa subdivision en espèces et sous-espèces (87)

Salmonella spp., nommées ainsi en l'honneur du médecin vétérinaire Daniel Elmer Salmon, ont été découvertes en 1889 et sont des bacilles à Gram négatif, de la famille phylogénétique des *Enterobacteriacea*, d'environ 2 à 5 µm de long pour 0,5 à 1,5 µm de largeur. Le genre *Salmonella* a divergé d'un ancêtre commun avec *Escherichia coli* il y a 100-160 millions d'années. Les membres de ce genre sont généralement mobiles avec une ciliature péritriche (87). Elles sont anaérobies facultatives et ne fermentent pas le lactose. Leur température optimale de croissance est comprise entre 35 et 37°C mais elles peuvent croître entre 5 et 50°C. De plus, elles peuvent se développer jusqu'à une activité de l'eau minimale de 0,94 (88–90).

Le genre *Salmonella* a souvent été sujet à des remaniements et est actuellement divisé en deux espèces, toutes potentiellement pathogènes : *Salmonella bongori*, et *Salmonella enterica* (**Figure 6**).

Salmonella bongori est une espèce établie en 2005 après une réévaluation de la nomenclature des *Salmonella* spp, étant auparavant une sous-espèce de *Salmonella enterica,* longtemps considérée comme la seule espèce du genre. *S. enterica* est divisée en six différentes sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*. Les sous-espèces sont à leur tour divisées en sérotypes en fonction de leurs antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) (91). Le nombre de sérotypes est différent en fonction de chaque sous espèce, *enterica* étant la sous-espèce en possédant le plus comme le montre le **Tableau 7** avec 1531 sérotypes connus. Il ressort en particulier que la sous-espèce *enterica* est celle qui comporte le plus de sérotypes différents, soit environ 59% des sérotypes de *Salmonella* spp. connus à ce jour.

Tableau 7 : Répartition des sérotypes connus en 2007 en nombre dans le genre *Salmonella* spp. (91)

Espèce	Sous-espèces	Nombre de sérotypes
Salmonella enterica		2557
	S. enterica subsp. *enterica*	1531
	S. enterica subsp. *salamae*	505
	S. enterica subsp. *arizonae*	99
	S. enterica subsp. *diarizonae*	336
	S. enterica subsp. *houtenae*	73
	S. enterica subsp. *indica*	13
Salmonella bongori		22
Total		**2579**

Initialement, les sérotypes appartenant à la sous-espèce *enterica* ont été nommés en fonction des aspects cliniques provoqués. Par exemple, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. Typhimurium, d'abréviation *S.* Typhimurium, a été appelée ainsi car elle provoquait la fièvre typhoïde chez les souris (Typhi-murium). Etant donné qu'il n'existe pas d'hôte spécifique aux *Salmonella* spp., les sérotypes ont été par la suite appelés en fonction de la ville dans laquelle elles ont été découvertes (*S.* London, *S.* Newport, ….) (87). L'ensemble des sérotypes connus à ce jour sont rassemblés dans le schéma de Kauffmann-White-Le Minor qui est régulièrement mis à jour.

Le réservoir principal de *Salmonella* spp. est le tractus digestif des mammifères et des oiseaux. Certaines souches peuvent être isolées d'autres animaux tels que les reptiles, les insectes et les animaux aquatiques. Une fois excrétée par son hôte, elle contamine l'environnement (eau, sol, plantes, etc…) où elle peut survivre pendant des mois et passer à l'hôte suivant (89). Il existe une exception, *S.* Typhi, dont l'homme est l'unique réservoir.

La maladie associée est la salmonellose, dont la salmonellose non-typhique et la salmonellose typhique. Cette dernière est uniquement due aux sérotypes Typhi et Paratyphi de la sous-espèce

enterica et se transmet de personne à personne ou par consommation d'eau ou d'aliments contaminés par des selles de personnes infectées (92, 93). Les salmonelloses non-typhiques sont les plus représentées et sont causées par les autres sérotypes de *Salmonella* spp.. L'aliment est vecteur de transmission dans 96% des cas de salmonellose (13). Elle se caractérise par l'apparition d'une gastroentérite aiguë environ 12 à 36 h après la consommation de l'aliment contaminé. Les principaux symptômes sont des nausées, des vomissements, des crampes abdominales, des diarrhées, des maux de tête, des frissons et de la fièvre, en général, entre 39 et 40°C. La durée des symptômes est le plus souvent comprise entre 5 et 7 jours mais la durée de contagion est de plusieurs semaines. C'est une maladie à issue favorable mais quelques complications existent, menant à l'hospitalisation de 22% des patients, comme la bactériémie (passage des bactéries dans le sang) dans 3 à 10% des cas et une déshydratation sévère. Cependant, le taux de mortalité de cette maladie est faible, soit 0,8% des personnes atteintes (13). Il existe également une forme asymptomatique de la maladie.

La relation dose-réponse (nombre de bactéries nécessaires pour déclencher la maladie) est mal connue et surtout difficile à établir pour le genre à la vue du nombre de sérotypes. Par exemple, concernant la relation dose-réponse, l'OMS indique que la dose de *S.* Enteritidis provoquant des troubles chez 50% des consommateurs, est de l'ordre de 10 000 bactéries, mais ne conclut pas sur le caractère extrapolable de cette relation aux autres sérotypes. Cependant, une méta-analyse récente indique que la dose infectieuse causant la salmonellose chez 50% des sujets exposés serait de l'ordre de quelques dizaines de bactéries pour les sérotypes Typhimurium et Enteritidis, quelle que soit la population exposée. Ces deux sérotypes de l'espèce *enterica* sont les plus impliqués dans les TIAC avec une variation de leur prédominance respective en fonction de l'année et de la zone géographique. Globalement, le nombre de foyers de salmonelloses par an est en diminution progressive même si récemment un variant du sérotype Typhimurium, variant monophasique, est en constante augmentation (92, 93).

Depuis de nombreuses années, l'élimination des *Salmonella* spp. dans les produits alimentaires est un challenge industriel (92). Son absence dans les produits alimentaires doit être vérifiée avant mise sur le marché (au minimum : absence dans 10 fois 25 g de produit). Cependant, ce n'est pas le seul pathogène pouvant être présent dans les produits alimentaires secs et, parmi eux, il est possible de retrouver *Cronobacter* spp. qui est très persistant dans les PS et qui présente un risque fort pour les populations sensibles comme les nourrissons.

2.1.2. *Cronobacter* spp., pathogène émergent de l'industrie agroalimentaire

Les infections à *Cronobacter* spp. sont peu répandues mais représentent un challenge pour les industries agroalimentaires productrices d'aliments pour nourrissons tels que le lait en poudre ou les PIF (74).

Les *Cronobacter* spp., nommées ainsi en référence au dieu Cronos de la mythologie grec qui mangeait ses enfants, ont été définis comme nouveau genre en 2008. Ils étaient auparavant tous rassemblés sous l'espèce *Enterobacter sakazakii*. Le genre *Cronobacter* rassemble des bacilles Gram négatifs de la famille phylogénétique des *Enterobacteriacea* d'environ 1 à 3 µm de long pour 0,5 à 1,5 µm de largeur. Les membres de ce genre sont généralement mobiles avec une ciliature péritriche. Ils sont anaérobies facultatives, ne fermentent pas le lactose et sont oxydase-négatives. Leur température optimale de croissance est d'environ 39°C mais peuvent se multiplier entre 5,5°C et 47°C (94).

En 2007, le genre *Cronobacter* a été proposé comme divisé en six espèces : *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* (divisée en 3 sous espèces) et *C.* genomospecies I. Exceptée la dernière, toutes ces espèces, isolées chez l'Homme, sont classées comme pathogènes opportunistes. Les isolats associés aux cas de méningites néonatales appartiennent aux espèces *C. sakazakii*, *C. malonaticus* et *C. turicensis* (94). Depuis 2012, une nouvelle espèce a été identifiée *C. condimenti* (portant le genre à 7 espèces) et *C.* genomospecies I a été renommé *C. universalis* (95) (**Figure 7**). Contrairement à *Salmonella* spp., aucun schéma de sérotypage n'est connu pour ce genre bactérien à l'heure actuelle.

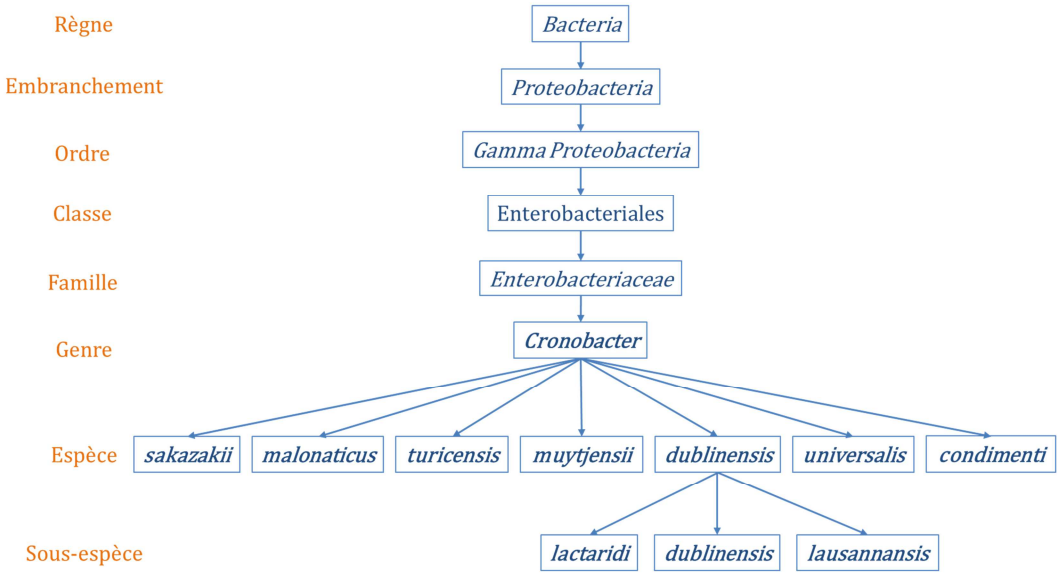

Figure 7 : Représentation schématique de la position du genre *Cronobacter* et de sa subdivision en espèces et sous-espèces (94)

Cronobacter spp. est une bactérie tellurique ubiquitaire qu'il est possible de retrouver à la fois dans l'eau, les sols, les végétaux, les poussières mais aussi dans un grand nombre d'êtres vivants qui sont généralement les vecteurs de contamination. *Cronobacter* spp. est également isolé d'un grand nombre d'aliments transformés (déshydratés, fumés, congelés, fermentés, crus ou cuits) (13).

La maladie associée à *Cronobacter* spp. se transmet uniquement par voie alimentaire et la transmission de personne à personne n'est pas démontrée. *Cronobacter* spp. étant un pathogène opportuniste, sa population cible est représentée en grande majorité par les nourrissons (en particulier les prématurés ou hypotrophes) et, en moindre partie, par les personnes âgées ainsi que les adultes immunodéprimés. L'apparition des symptômes a lieu entre 6 et 15 jours après l'ingestion d'aliments contaminés (96, 97). La **Figure 8** représente les différents symptômes de la maladie en fonction de la population. Le principal symptôme chez le nourrisson est la méningite, avec 41% des cas, et chez l'adulte une colonisation du tube digestif, avec 35% des cas.

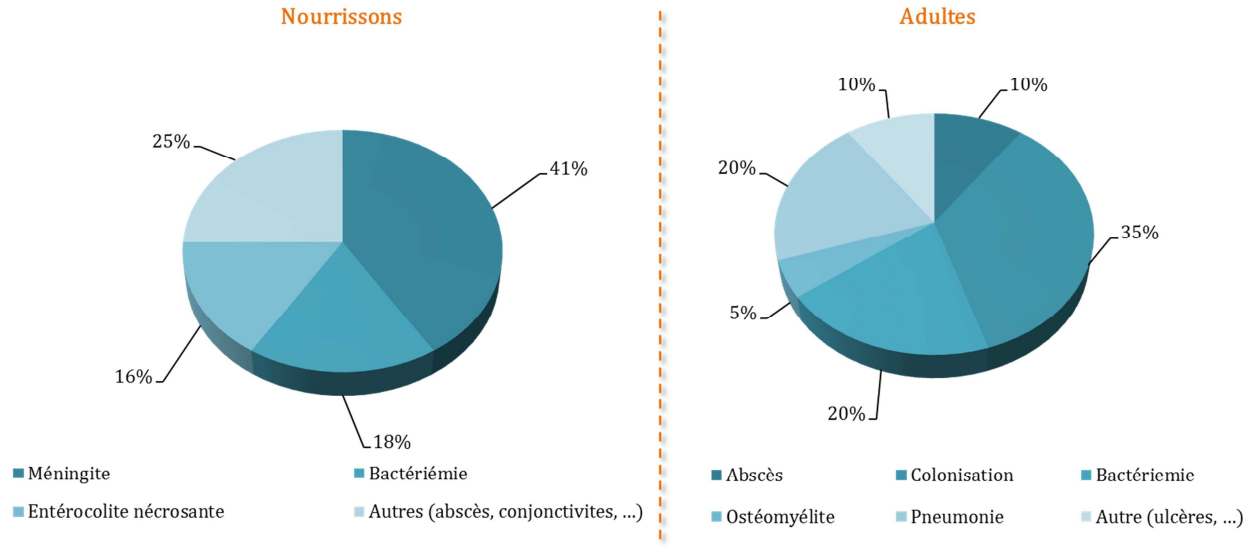

Figure 8 : Représentation des symptômes en fonction de la population atteinte par *Cronobacter* spp. (13)

La durée des symptômes est variable en fonction de la forme clinique de la maladie. Chez les nourrissons, le taux de létalité est compris entre 40 et 80% en fonction de l'espèce de *Cronobacter* spp. impliquée, par exemple, le taux de létalité de *C. sakazakii* est de 80%. Des complications peuvent aussi avoir lieu comme des séquelles neurologiques sévères (hydrocéphalie, …) ou un retard de développement. Les conséquences chez l'adulte sont, quant à elles, mal connues. Il existe également une forme asymptomatique de la maladie. La relation dose-réponse n'est pas connue. Globalement, le nombre de foyers de TIAC à *Cronobacter* spp. déclarés reste relativement faible avec environ 6 nouveaux cas par an à travers le monde. Cependant, la prise de conscience de l'importance de la maladie étant relativement récente, la déclaration n'est pas réglementée et le nombre de cas est certainement sous-estimé (13).

Ces deux bactéries sont régulièrement retrouvées dans des PS ou dans des TIAC impliquant ce type de produits alimentaires. Elles ont donc dû s'acclimater à des quantités très faibles en eau, c'est-à-dire s'acclimater à un séchage.

2.2.Séchage/réhydratation de *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp.

La survie des pathogènes, et notamment de *S. enterica*, a été grandement étudiée dans des produits tels que le chocolat ou les amandes, même si beaucoup de questions restent sans réponse (98).

2.2.1. Les échanges d'eau entre la cellule et son environnement lors d'un séchage et d'une réhydratation

De manière générale, le séchage suivi d'une réhydratation peut être décomposé en plusieurs étapes présentées en **Figure 9** (19, 98–101) :

i. Le séchage initial en milieu liquide (**Figure 9 (1)**) : C'est la première phase de retrait d'eau des cellules qui doivent répondre rapidement pour réduire la perte de turgescence et les dommages occasionnés sur la membrane. Cette première phase correspond à un stress osmotique. En effet, lors d'un séchage, le milieu à forte activité de l'eau (le produit alimentaire ou une suspension de microorganismes par exemple) est mis en contact avec un air à faible activité de l'eau ce qui va engendrer des mouvements d'eau du milieu à forte activité de l'eau vers l'air. Dans le cas où l'air est en excès, il est possible de considérer que le séchage du milieu à forte activité de l'eau s'effectue jusqu'à atteindre l'activité de l'eau de l'air.

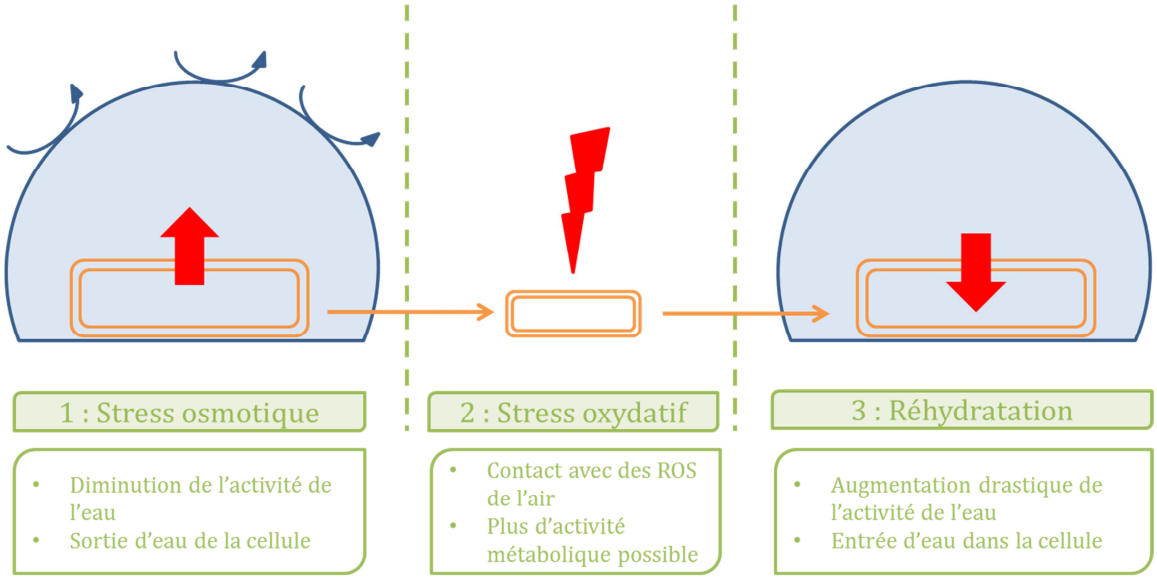

Figure 9 : Représentation schématique des différentes étapes se produisant lors d'un séchage suivi d'une réhydratation

ii. Le séchage en milieu solide humide (**Figure 9 (2)**) : Cette phase correspond à un contact direct des cellules avec l'air et en particulier avec les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxigen Species, ROS), provoquant un stress oxydatif.

iii. La réhydratation (**Figure 9 (3)**) : Cette étape est indissociable du séchage à proprement parler. Lors de cette étape, les cellules sèches sont mises en présence d'eau créant un stress hypoosmotique. En effet, elles sont mises en contact avec un milieu à forte activité de l'eau, ce qui va engendrer des mouvements d'eau du milieu de réhydratation vers le produit et les microorganismes.

Plusieurs méthodes industrielles permettent de sécher les produits alimentaires sont couramment utilisées. Parmi elles, il est possible de citer le lit fluidisé, l'atomisation et la lyophilisation.

Durant ces trois périodes, certains mécanismes actifs et passifs se mettent en place favorisant la survie de la cellule à cet ensemble de stress que constitue un cycle de séchage/réhydratation.

2.2.2. Résistance des bactéries au séchage

2.2.2.1. Mécanismes actifs de la résistance au séchage

Un changement de pression osmotique aboutit à un passage des molécules d'eau à travers la membrane du cytosol vers le milieu extracellulaire, en passant directement au travers des membranes interne et externe ou en passant vers le milieu extérieur grâce à des protéines membranaires, les aquaporines. Ce changement d'osmolarité implique l'activation de réponses physiologiques et génétiques rapides pour contrebalancer cette perturbation (102, 103).

Chez *Salmonella* spp., le changement de pression osmotique provoque l'activation de nombreux gènes et notamment de l'opéron *kdpFABC* qui code pour un système de transport à haute affinité pour l'ion potassium (K^+) (86, 102). En conséquence, il y a une accumulation de K^+ et de glutamate, servant de contre-ions, dans le cytosol. Cette réponse est également observée chez *Cronobacter* spp., bien que les voies de régulation chez cette bactérie soient moins bien connues. Une analyse *in silico* permet de constater la présence de nombreux gènes analogues à ceux impliqués dans la réponse au stress chez *Escherichia coli* (104), eux-mêmes analogues à ceux présents chez *Salmonella* spp. Cependant, cette accumulation est temporaire et est suivie par une accumulation de solutés compatibles, peuvent être cités à titre d'exemple : la proline, la glycine bétaine, l'éctoïne ou encore le tréhalose (102). Ce sont des composés organiques importés du milieu extérieur ou synthétisés *de novo*. L'accumulation d'osmoprotectants permet aux bactéries de maintenir une turgescence idéale. Leur rôle, qui mime celui de l'eau, est de stabiliser les molécules comme les protéines et les phospholipides (98, 105), comme présenté en **Figure 10**.

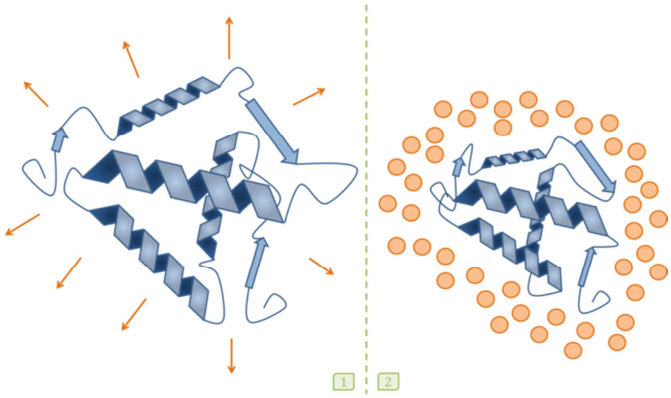

Figure 10 : Schéma de la stabilisation d'une protéine par les osmoprotectants (d'après (105)). 1 : Perte d'eau, dénaturation de la protéine. 2 : Présence de solutés compatibles, stabilisation de la structure de la protéine

C'est pourquoi de des transporteurs se trouvent en grande quantité sur la membrane interne (**Figure 11**) pendant une période de stress, comme ProP et ProU, un transporteur ABC et un transporteur symport à hydrogène (H^+) (86, 102) respectivement, ainsi que OsmU, un autre transporteur ABC (86). Ils sont tous trois capables de transporter un grand nombre de solutés compatibles différents (102). Leur expression est augmentée pendant la dessiccation, comme le montre une étude sur la résistance à la dessiccation chez *Salmonella* spp. (86, 106). De plus, les protéines de la membrane externe OmpC et OmpF sont surexprimées, ce qui facilite l'entrée des solutés compatibles dans le périplasme, via un système de régulation à deux composants EnvZ/OmpR (86, 102, 107). En condition normale, OmpF est prédominante dans la membrane externe mais, en cas de stress osmotique, les proportions s'inversent et OmpC devient prédominante (86). Des protéines analogues ont été identifiées chez *Cronobacter* spp. par la précédente étude *in silico* et leur expression a été vérifiée dans plusieurs études montrant une surexpression de certaines protéines comme OmpC (104, 108).

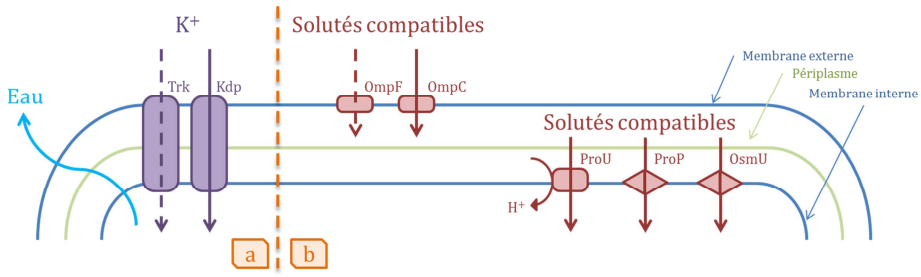

Figure 11 : Présentation des transporteurs majeurs de *Salmonella* spp. impliqués dans la réponse au stress osmotique en présence de solutés compatibles dans le milieu extérieur. a : Réponse primaire, entrée de K^+. b : Réponse secondaire : Entrée de solutés compatibles

Si ces molécules ne sont pas disponibles dans le milieu extracellulaire, *Salmonella* spp. est capable de synthétiser du tréhalose comme osmoprotectant par une voie alternative au cycle de Krebs. L'activation de l'opéron *otsBA* va permettre la traduction des protéines impliquées dans la synthèse du disaccharide, la tréhalose-6-phosphate phosphatase et la tréhalose-6 phosphate

synthétase (86, 102, 103, 107, 109, 110). La régulation de l'opéron *otsBA* se fait par l'intermédiaire d'un facteur de transcription, le facteur σ^S (102). De plus, l'étude *in silico* (104) a révélé la présence de gènes analogues à l'opéron *otsBA* présent chez *S. enterica* chez *Cronobacter* spp. mais de nombreuses études montrent aussi l'accumulation de tréhalose chez cette dernière pendant le séchage, comme montré en **Figure 12** lors d'un séchage à 25°C dans une enceinte avec une humidité relative de 20,7% (soit une a_W dans l'enceinte de 0,207) (20).

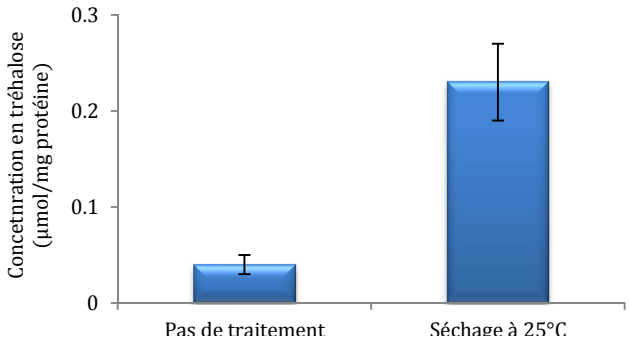

Figure 12 : Concentration en tréhalose des cellules de *Cronobacter* spp. sans traitement ou après séchage à 25°C dans une enceinte à 20,7% d'humidité relative (d'après (20))

Une récente étude sur *Cronobacter* spp. et *E. coli* sur des souches sauvages (ou « wild type », WT) et des souches délétées pour le gène *otsA* (*ΔotsA*) s'intéresse à leur survie après un séchage de 46 jours dans une atmosphère à une a_W de 0,23 (98). Il ressort que la survie d'*E. coli* est différente d'environ 3,5 log entre le WT survivant mieux à la dessiccation et le mutant *ΔotsA*. Cependant, pour *Cronobacter* spp., cette différence est moins flagrante avec un écart de moins de 0,5 log entre le WT et le mutant *ΔotsA.* Ainsi, le rôle du tréhalose dans la survie de *Cronobacter* spp. à la dessiccation est moins connu. Cette production de tréhalose est reliée à une augmentation du taux de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, permettant ainsi d'augmenter la production d'énergie cellulaire.

Cependant, afin de répondre aux stress, les bactéries doivent percevoir les changements environnementaux. En ce qui concerne la perception du stress osmotique, c'est le système de régulation à deux composants EnvZ/OmpR qui est impliqué, où EnvZ est le senseur et OmpR le régulateur de réponse (102, 111–116). EnvZ est une protéine dimérique enchâssée dans la membrane interne par deux domaines transmembranaires, elle contient un domaine périplasmique et un domaine cytoplasmique dans chaque sous-unité, comme présenté en **Figure 13** (113).

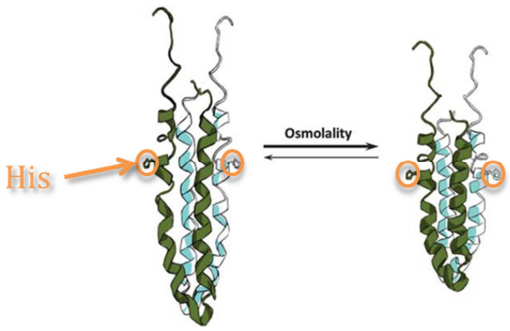

Figure 13 : Modèle d'étirement-relaxation pour les domaines cytoplasmiques de EnvZ lors des changements osmotiques, repris de (113). En orange : résidus histidine

Lors des changements d'osmolarité du milieu extérieur (augmentation de la pression osmotique), l'eau sort passivement depuis l'intérieur des cellules bactériennes vers le milieu exterieur. Le domaine cytoplasmique de la protéine transmembranaire est alors soumis à des changements dans les liaisons hydrogènes (ou liaisons H) et prend confitguration repliée facilitant l'autophosphorylation des résidus histidines (His) et le phosphotransfert à OmpR sur deux résidus asparates (Asp) (113, 116). Une fois phosphorilé, OmpR a plus d'affinité pour les séquences des promoteurs des gènes *ompF* et *ompC*, codant pour les protéines de la membrane externe OmpF et OmpC et l'activation de gènes de réponse (116). Un système analogue existe pour l'activation des gènes de l'opéron *kdpFABC*, c'est le système KdpD/KdpE (102, 117), où KdpD est le senseur et KdpE est le régulateur de réponse, permettant ainsi la transcription de l'opéron *kdpFABC* et la production de transporteurs à K^+ (117).

Chez *S.* Typhimurium, une étude de 2005 a décrit la chronologie de l'activation des gènes lors d'un stress osmotique. Il en ressort que la transcription des gènes *rpoS*, *proU* et *proP*, soit l'expression du facteur de transcription de réponse générale au stress ainsi que des transporteurs pour les solutés compatibles, est induite dans les premiers instants du stress (détectés à partir de 3 min de stress). L'activation de l'opéron *kdpFABC*, pour favoriser l'entrée de K^+, est plus tardive, suivie de l'activation de l'opéron *otsBA* et des gènes impliqués dans l'importation des solutés compatibles (118). Cette étude est effectuée lors d'un choc osmotique dans du NaCl (Chlorure de Sodium) à 0,3 M. Il est donc possible de penser que les ARN transcrits soient différents ou exprimés de façons différentes lors d'un séchage. Il ressort tout de même que cette réponse est relativement rapide avec l'activation des derniers opérons impliqués après 10 min de choc osmotique (118).

Le gène *rpoS* est un gène codant le facteur de transcription RpoS ou σ^{38} ou encore σ^S. Il a été rapidement décrit comme intervenant lors de la réponse au stress nutritif puis pour de nombreux autres stress. σ^S va permettre la transcription de nombreux gènes en réponse aux stress en se fixant à une séquence de l'ADN reconnue (promoteur). L'ARN polymérase, enzyme

responsable de la transcription de l'ADN en ARNm, va se fixer au facteur de transcription σ^S et induire l'initiation de la transcription du gène situé en aval du promoteur (14). En condition de croissance idéale, un facteur de transcription est aussi nécessaire pour la transcription des gènes. Il s'agit d'un facteur de transcription standard, le facteur σ^D ou σ^{70}. Ainsi lors d'un stress, σ^S et σ^D entrent en compétition et augmentent la transcription des gènes appartenant aux régulons de RpoS (14, 119). De par son rôle clé lors de la réponse au stress, *ropS* est soumis à une régulation complexe pas encore totalement élucidée, mais la transcription, la stabilité, la translocation et la protéolyse permettent de réguler l'expression de ce gène (14, 120–125).

Lors d'un séchage, l'expression de σ^E est augmentée sous le contrôle de σ^S. Etant donné que ce facteur de transcription active également la réponse au stress oxydatif, une production de transcrits et de protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif prend place pendant un stress osmotique (86, 99, 100, 102, 104, 107). Ceci induit une résistance accrue pour la deuxième partie du séchage, phase pendant laquelle peu de mécanismes actifs peuvent prendre place vue la faible activité de l'eau (102). Dans le régulon de σ^E, les gènes sont impliqués dans le métabolisme énergétique, dans la synthèse des protéines, dans le transport des protéines ainsi que dans leur fixation. Une étude montre que le nombre de gènes régulés par σ^E est d'environ 150 en fonction du milieu utilisé dont certains sont clés pour la résistance au séchage (126). Par exemple, le gène *fnr* code pour un régulateur transcriptionnel sensible à l'oxygène, le FNR (Fumarate and Nitrate Reduction protein). C'est un régulateur de transcription globale qui est impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la mobilité ou encore la virulence chez *Salmonella* spp.. FNR perçoit l'oxygène par un passage du cluster dimérique [4Fe-4S] en cluster monomérique [2Fe-2S]. La mutation du gène *fnr* diminue grandement la survie de *Salmonella* spp. pour atteindre un état sec mais aussi sa persistance à sec (102, 107).

De manière globale, la réponse active de *S. enterica* et *Cronobacter* spp. à la dessiccation est un phénomène complexe faisant intervenir rapidement de nombreux gènes et de nombreuses protéines. Bien que toutes ces réponses cellulaires ne soient pas encore identifiées, il semble qu'elles soient différentes en fonction des milieux étudiés. (17, 86).

Au-delà des mécanismes actifs, des mécanismes passifs se mettent en place aussi bien en début de séchage qu'en fin de séchage, lorsqu'une activité de l'eau inférieure au seuil physiologique est atteinte.

2.2.2.2. Mécanismes passifs de la résistance au séchage

2.2.2.2.1. Mécanismes passifs en lien avec la membrane

Il est possible de distinguer des mécanismes passifs en lien avec les propriétés intrinsèques de ces bactéries, comme la composition de la surface de la cellule, ainsi que sa capacité à sécréter

une matrice extracellulaire. Par exemple, les lipopolysaccharides, composant la membrane externe des bactéries Gram-négatives, jouent le rôle de « capteur » d'eau créant un microréservoir autour de la cellule permettant de ralentir la sortie d'eau offrant alors un temps supplémentaire à l'acclimatation de la bactérie (18, 102, 127). C'est également le cas d'autres structures comme les fimbriae (molécule d'adhésion aux surfaces et aux cellules), les curlis (fimbriae de petite taille) (102, 128) ou encore la production de cellulose, composant la matrice extracellulaire des bactéries (128, 129). De même, ces deux bactéries sont capables de synthétiser des capsules constituées principalement d'exopolysaccharides et de protéines en réseau ralentissant la sortie de l'eau (129–133).

2.2.2.2.2. Mécanismes en lien avec les macromolécules

Il est admis que l'activité de l'eau influence l'activité enzymatique (**section 1.1**). Les macromolécules comme les protéines sont également impactées par le séchage. En effet, l'activité de ces molécules est souvent liée à des changements conformationnels qui, en absence d'eau, ne peuvent se réaliser. En effet, l'absence d'eau va entrainer un repliement des macromolécules empêchant ainsi l'accès du site actif aux substrats, mais également à d'autres molécules. Dans le cadre du stress oxydatif qui a lieu lors du séchage à l'état solide, il est possible d'imaginer que cette conformation protège le site actif des attaques de ROS, comme présenté en **Figure 14** (134).

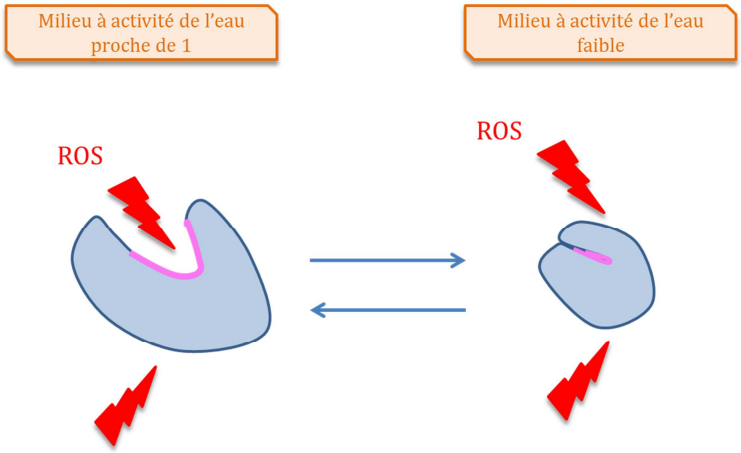

Figure 14 : Schéma du repliement des macromolécules en fonction de l'activité de l'eau et les conséquences sur les stress oxydatifs (134)**. Le site actif est représenté en rose.**

Dans ce schéma (**Figure 14**), le repliement des macromolécules (en bleu) est présenté en fonction de l'activité de l'eau. Dans un milieu avec une activité de l'eau proche de 1, la molécule possède une conformation active et son site actif (en rose) est accessible pour le substrat mais aussi pour d'éventuels ROS présents dans le milieu. De manière opposée, à faible activité de l'eau, la molécule est repliée et ainsi son site actif est inaccessible. Les macromolécules passent

d'une conformation à l'autre en fonction de l'activité de l'eau si les liaisons intramoléculaires impliquées dans sa fonctionnalité ne sont pas altérées (134).

L'ensemble de ces mécanismes actifs et passifs de résistance au séchage et à la réhydratation permet de concevoir aisément que *S. enterica* et *Cronobacter* spp. se retrouvent dans les PS. Cependant, ils ne sont pas complétement suffisants pour prévenir l'inactivation bactérienne pendant le séchage.

2.2.3. Conséquence d'un cycle de séchage/réhydratation sur les cellules bactériennes

Les conséquences d'un cycle de séchage/réhydratation sur les cellules peuvent avoir lieu à différents niveaux durant les deux phases d'un cycle.

2.2.3.1. Conséquence du séchage

Chez les bactéries, la composition lipidique de la membrane a été relativement bien définie avec des lipides polaires présentant différents arrangements de longueur de chaîne, le degré de saturation, la conformation d'isomères, la ramification, et une cyclisation. L'état biologiquement actif de la membrane est un état dit liquide cristallin ou liquide désordonné (Lα) (**Figure 15**). Ainsi, les facteurs extrinsèques pouvant agir sur la membrane, tels que la température, les changements osmotiques, les oxydants ou encore les acides, vont engendrer des changements de propriétés des lipides.

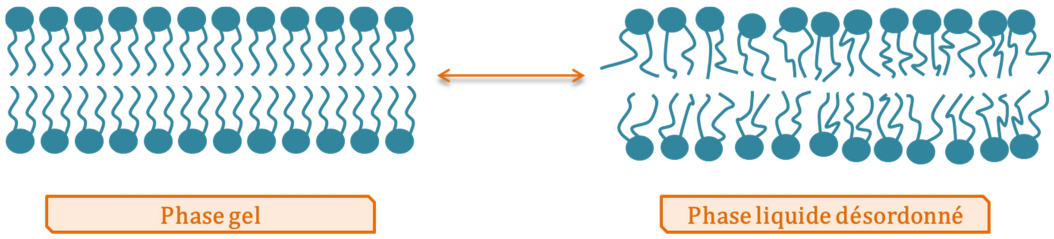

Figure 15 : Différentes phases membranaires rencontrées dans les membranes bactériennes (135)

Le paramètre le plus couramment mesuré des changements de phase de membrane est la transition gel-liquide cristallin défini par la température à laquelle le point les phospholipides entre en fusion, c'est-à-dire la température à laquelle 50% des chaines acyles sont entrées en fusion dans la membrane. Cette température est dite « température de transition cristalline » ou « température de transition de phase gel-liquide cristallin » (T_m, *melting temperature*) caractérisant le passage d'un état rigide (phase gel) ou hautement ordonné à un état liquide désordonné (**Figure 15**) (135). De plus, à la vue de la complexité des membranes bactériennes mais aussi à la diversité des phospholipides qui la composition, il est possible de rencontrer les deux phases au sein d'une même cellule. Ainsi, pour maintenir un état membranaire permettant

une activité physiologique, la T_m de l'ensemble des phospholipides aux seins d'une même membrane est en générale maintenue à 10-15°C en dessous de la température optimale de croissance. Par exemple, la T_m de *Salmonella enterica* serait donc de 22-27°C et de 24-29°C pour *Cronobacter* spp. (136).

Dans la membrane plasmique, la déshydratation augmente les interactions de van der Waal's entre les têtes hydrophiles des phospholipides. Cette augmentation va promouvoir le passage d'un état liquide-cristallin à l'état gel, c'est-à-dire la transition de phase de la membrane (136, 137). Dans le cas de déshydratations sévères, cette transition peut conduire à une modification de la perméabilité membranaire (138, 139), voire mener à une perte d'intégrité membranaire, ce qui pourrait être une des causes de l'inactivation bactérienne pendant un séchage drastique.

Par ailleurs, le séchage engendre une sortie d'eau de la cellule, ce qui provoque une perte de volume de la cellule. Ce phénomène a été notamment observé chez *S. cerevisiae* suite à différents stress osmotiques, avec des intensités différentes. Il ressort que le volume cellulaire diminue, au maximum, d'environ 50% par rapport au volume initial (140). Ce phénomène est bien étudié chez la levure et le plus petit volume atteint est représentatif des stress hyperosmotiques de fortes amplitudes. Lors des variations volumiques engendrées par la déshydratation, il y a donc une augmentation du rapport surface/volume de la levure et un excès de surface membranaire apparaît, formant ainsi des replis voire des vésicules au niveau de la membrane (140, 141). Cependant, peu d'études sont focalisées sur ce phénomène chez les bactéries, notamment des études chez *E. coli* lors d'une déshydratation au glycérol (142) ou encore dans des milieux avec du sucre ou du sel (139, 143, 144), comme présenté en **Figure 16**.

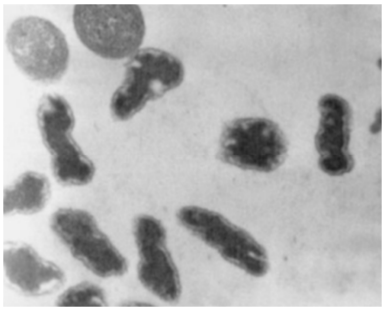

Figure 16 : Micrographe obtenu en microscopie électronique à transmission de *E. coli* K12 stressée osmotiquement à une activité de l'eau d'environ 0,750 (142)

Cette image a été prise après une déshydratation dans une solution eau-glycérol à une activité de l'eau d'environ 0,750. Les bacilles n'ont pas une forme régulière et sont légèrement écrasés sur eux-mêmes et au niveau de la membrane interne, des invaginations sont notables, visibles grâce aux zones blanches dans le cytoplasme en gris foncé (**Figure 16**) (142). La membrane externe ne présente pas d'invagination ou vésiculation, bien que le volume cellulaire soit diminué. Il est possible de penser que cette vésiculation ait eu lieu vers le milieu extérieur et donc n'apparaisse

pas sur ce cliché, ceci ayant déjà été observé pendant un stress (145). Une diminution du volume cellulaire a été également montrée sur *E. coli* dans le cas d'un stress salin, qui abaisse également l'activité de l'eau (139).

La structure d'une protéine est maintenue par des interactions de différentes natures : les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les forces de van der Waal's. Ainsi, la perte de l'eau provoquée par le séchage va altérer ces interactions et aboutir à une perte de fonctionnalité. Cette dénaturation est souvent réversible mais peut être irréversible. De plus, une agrégation protéique peut être remarquée dans certains cas de déshydratation causée par les liaisons hydrogènes ce qui conduit à des interactions protéine-protéine.

2.2.3.2. Conséquence de la réhydratation

Peu d'études se focalisent sur l'importance de la réhydratation des pathogènes alimentaires inclus dans des milieux secs alors que cette étape est indissociable du séchage.

Néanmoins, quelques études s'intéressent sur la réhydratation de certains microorganismes dans des milieux à faible activité de l'eau. Par exemple, dans le cas de stress osmotique chez *Saccharomyces cerevisiae*, une étude sur la perméabilité membranaire a été effectuée par cytométrie en flux après différents stress osmotiques pour atteindre une a_W de 0,350 avec différentes réhydratations pour augmenter l'activité de l'eau jusqu'à 0,595, 0,678, 0,769, 0,817, 0,865, 0,912, 0,948 et 0,990. Il ressort de cette étude que plus la différence entre la pression osmotique du stress et la pression osmotique atteinte une fois réhydratée est grande, plus la perméabilisation cellulaire est importante. Comme la perméabilité membranaire est en lien avec la mort cellulaire, la réhydratation peut aussi être une cause importante de mort cellulaire (146). Une récente étude s'intéresse également à la réhydratation de *Listeria monocytogenes* sur des surfaces en fonction de l'humidité relative de l'atmosphère à laquelle elles ont été préalablement séchées. Deux cinétiques de réhydratation ont été testées : une réhydratation lente et une réhydratation instantanée. Il ressort globalement une augmentation de la perte de cultivabilité d'un facteur 100 était obtenue avec une réhydratation instantanée par rapport à une réhydratation lente (147). Cependant, ces études se basent soit sur des levures soit sur des bactéries à Gram-positifs (101, 146–150). Il est donc concevable qu'une différence puisse être observée entre ces microorganismes et *S. enterica* ou *Cronobacter* spp.. Finalement, une étude sur *E. coli*, genre phylogénétiquement proche de *S. enterica* et *Cronobacter* spp., montre une diminution de la survie lors de cinétiques de réhydratation rapides. Dans cette étude, les auteurs proposent le rôle de la vésiculation qui a lieu lors du séchage comme une cause de diminution de la surface disponible lors de la rentrée d'eau dans la cellule au cours de la réhydratation. En effet, lors de la réhydratation, une entrée d'eau brusque dans la cellule augmente le volume cellulaire plus ou moins rapidement en fonction de la vitesse de réhydratation. Ainsi, plus la

réhydratation est lente plus la rentrée d'eau est longue, ce qui laisse le temps à la cellule de se réorganiser en retrouvant une surface cellulaire adaptée et/ou en relarguant dans le milieu des ions/solutés internalisé lors de la déshydratation (142). Cependant, peu d'études sont axées sur la réhydratation des pathogènes secs dans les PS.

De plus, au cours de la réhydratation, les phospholipides subissent également une transition de phase dans le sens inverse de celle provoquée par la déshydratation. Cette transition pourrait expliquer la fuite de solutés de la cellule aboutissant à une inactivation bactérienne.

Par ailleurs, il a été vu que cette réponse adaptative lors d'un stress osmotique permet aussi l'activation de la réponse au stress oxydatif, ce phénomène de réponse intégré aux stress permet une réponse bactérienne à large spectre alors que la bactérie ne subit qu'un seul stress.

2.3.La réponse intégrée aux stress

La survie à un stress dépend de l'histoire de la bactérie. En effet, lors d'un traitement thermique sur un produit sec, elles ont déjà rencontré un stress préalable qui est le séchage. Il a précédemment été montré que les bactéries s'étaient adaptées à ce milieu à faible activité de l'eau mais lors de cette acclimatation, un phénomène de cross-protection ou de réponse intégrée s'opère également. Plus exactement, ceci signifie qu'en réponse à une perturbation environnementale, des réponses à large spectre vont se mettre en place.

La réponse intégrée aux stress peut prendre plusieurs formes et impliquer plusieurs acteurs (151, 152), présentée en **Figure 17** :

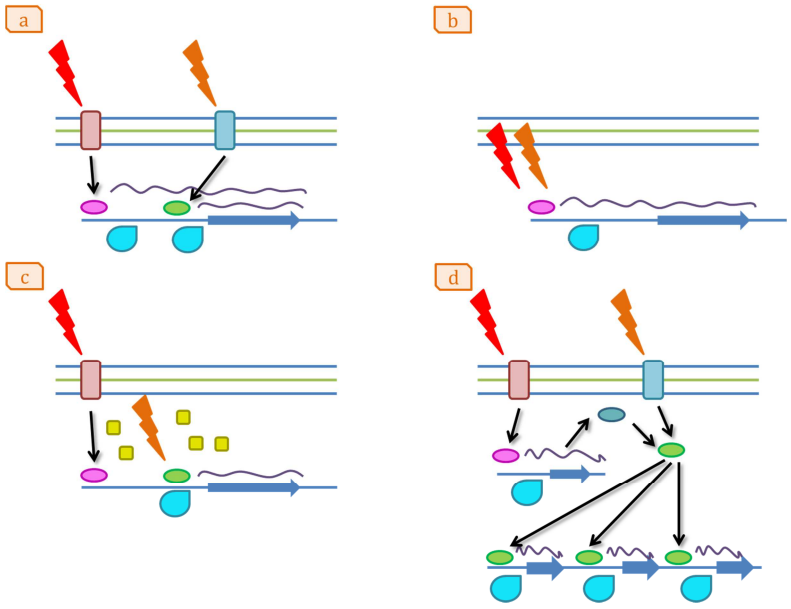

Figure 17 : Phénomènes de cross-protection connus chez *Salmonella* spp.. En (a) : Activation d'un gène par deux promoteurs différents, en (b) : Versatilité du senseur, en (c) : Activation d'antagoniste de répresseur, en (d) : Activation en cascade. En orange et en rouge : deux stress différents, en vert et rose : facteur de transcription activé par un senseurr, en bleu turquoise : l'ARN polymérase. D'après (151).

a. Activation d'un gène par différents promoteurs (**Figure 17 (a)**)

Par exemple, le gène *rpoH* codant pour le facteur de transcription σ^H, qui permet l'activation des gènes de réponse au stress thermique, possède quatre promoteurs différents. Trois d'entre eux sont reconnus par σ^D et un par σ^E. Ainsi le gène *rpoH* est activé par deux types de facteurs de transcription soit deux promoteurs (**Figure 17 (a)**).

b. Versatilité de la molécule senseur, qui perçoit les perturbations environnementales (**Figure 17 (b)**)

C'est le cas du facteur de transcription FNR qui active différents groupes de gènes en fonction de l'environnement. En effet, les gènes activés seront différents en fonction des conditions anaérobie et aérobie mais ils seraient aussi capables de percevoir les changements en nitrate du milieu (**Figure 17 (b)**).

c. Antagonisme aux répresseurs de gènes : le senseur va activer un anti-répresseur et également une protéine de liaison à l'ADN, qui vont permettre l'activation du gène de réponse au stress (**Figure 17 (c)**)

Peu de schémas de cette forme sont connus à l'heure actuelle lors du séchage.

d. Activation en cascade : un activateur transcriptionnel va être activé soit directement par un signal de l'environnement soit par une autre molécule elle-même produite en réponse à un stress (**Figure 17 (d)**)

Finalement, l'activation en cascade a également lieu pendant le séchage. Par exemple, en réponse au stress oxydatif, σ^E va activer σ^H qui lui-même va activer de nombreux gènes de réponse au stress thermique (151, 153, 154). En effet, σ^E est surexprimé pendant un séchage ou une dessiccation. Par conséquent, cela entraine la surexpression de σ^H et l'activation de nombreux gènes impliqués dans la réponse thermique. La réponse au stress thermique par σ^H active notamment la transcription de plus de 30 Heat Shock Proteins (HSP, protéines de choc thermique). Elles sont généralement regroupées sous sept classes présentées dans le **Tableau 8** (102, 151).

Tableau 8 : Les sept classes de HSP

Famille	Note
Chaperonne	Classe prédominante en terme d'expression
Protéase	Permet d'éliminer les protéines dénaturées et les agrégats
Réparation de l'ADN ou ARN	Protéines modifiants l'ADN et les ARN permettant de réduire les dommages de l'ADN (méthylation…)
Enzyme impliquée dans le métabolisme	Très espèce-dépendant, notamment un changement dans les voies métaboliques
Protéine régulatrice	Facteur de transcription, protéine de réponse au stress
Protéines de la structure cellulaire	Protéines impliquées dans la structure du flagelle
Protéines de transport, de détoxification et de modulation de la membrane	Permet de maintenir la stabilité membranaire et sa fonction

Les HSP vont ainsi prévenir la dénaturation des protéines pendant le séchage, mais également pendant le stress thermique sous-jacent. Ainsi, elles maintiennent les structures des protéines du cytosol et de la membrane, les protégeant de la dénaturation protéique, mais également de l'agrégation. Parmi les protéines chaperonnes, nous pouvons citer DnaK qui est l'une des plus étudiée chez *Salmonella* spp., également présente chez *Cronobacter* spp., qui se lie aux protéines dénaturées, en complexe avec DnaJ.

Globalement, la réponse au stress chez les bactéries n'est jamais spécifique à un seul stress et va donc engendrer une réponse générale au stress lors du séchage. Ainsi, à l'état sec, les bactéries posséderont un pool enzymatique de réponse au stress thermique et notamment des chaperonnes protégeant les structures telles que les protéines du cytosol et de la membrane. Ce pool va donc accroître leur résistance thermique et par conséquence leur inactivation sera plus compliquée à mettre en œuvre. De plus, il a été montré que d'autres facteurs, non développés ici, interviennent sur la résistance au stress des microorganismes comme la phase de croissance (155), la température de croissance (103, 156–158), la composition du milieu (27, 157, 159), le pH (160), la souche (161), etc…

Ces deux bactéries, *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp., sont dites pathogènes. Un pathogène est un organisme capable de causer des dommages cellulaires en infectant certains tissus, causant l'apparition de signes cliniques pouvant conduire à de la morbidité et de la mortalité. En particulier, elles ont la capacité de se développer au sein de l'hôte et sont donc entéroinvasives. Pour ce faire, elles possèdent des voies d'activation pour exprimer leur virulence. Ainsi, au vu de la réponse intégrée aux stress, il est possible d'envisager que cette réponse intégrée interfère avec d'autres voies métaboliques comme les mécanismes de virulence.

2.4. *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp., deux bactéries entéroinvasives

2.4.1. La virulence chez *Salmonella* spp.

La virulence et les mécanismes impliqués dans la virulence de *Salmonella* spp. ont été largement étudiés depuis sa découverte. Nous allons détailler uniquement le cas des gastroentérites et non celui de la fièvre typhoïde (sérotypes Typhi et Paratyphi), maladie qui n'est pas liée à la consommation de PS.

2.4.1.1. Schéma général du cycle de virulence chez *Salmonella* spp.

Après son ingestion, *S. enterica* passe le long du tube digestif avec le bol alimentaire, jusqu'au gros intestin (**Figure 18 (1)**). Ces bactéries ont la possibilité de se déplacer grâce à leurs flagelles, constitué de flagelline, protéine qui est différente entre chaque sérotype de *Salmonella* spp.. Le

flagelle confère la capacité de se déplacer aux bactéries en faisant intervenir des informations chimiques reçues au niveau de récepteurs membranaires et influençant la rotation du moteur du flagelle. Ceci permet à la bactérie d'orienter son déplacement. Les récepteurs membranaires font partie d'un système de chimiotactisme (162–165).

Salmonella spp. se retrouve en compétition avec le microbiote de son hôte et peut, dans certaines zones, devenir majoritaire. Elle a un tropisme (réaction d'orientation avec déplacement provoquée et dirigée par un *stimulus* externe de nature physique ou chimique) particulier pour les tissus lymphoïdes intestinaux et passe à travers les cellules M (**Figure 18 (4)**) présentes dans l'épithélium associé aux follicules recouvrant les plaques de Peyer. Chez un individu sain, ces cellules ingèrent les cellules du microbiote pour maintenir l'homéostasie du tube digestif, ce qui profite à *S. enterica* pour faciliter son passage de la paroi intestinale. Indépendamment des cellules M ou dendritiques, *S. enterica* est capable de coloniser l'épithélium apical, composé de cellules épithéliales, dans le gros intestin.

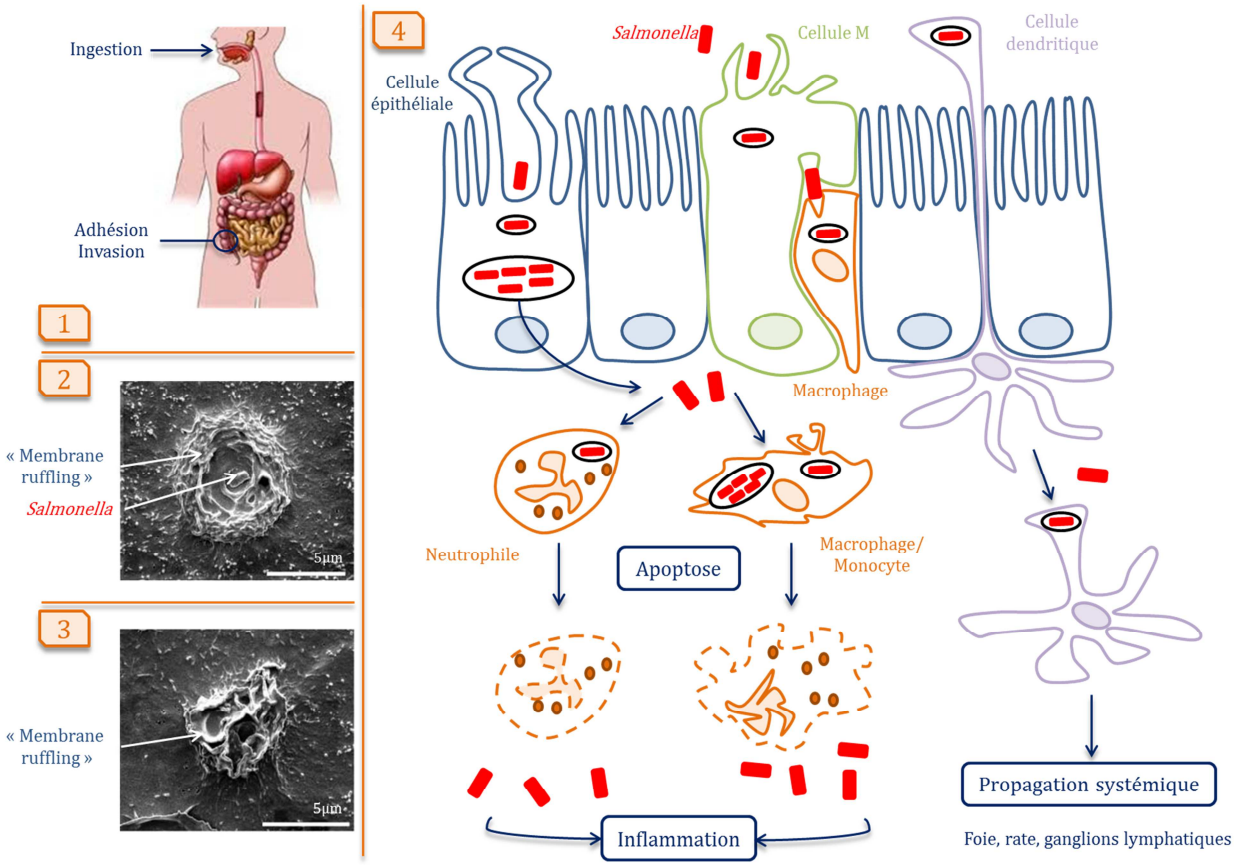

Figure 18 : Invasion de *Salmonella enterica* dans un hôte humain. (1) : *S. enterica* est ingérée et va être transportée par le bol alimentaire jusqu'au gros intestin où elle va adhérer à la paroi intestinale et envahir son hôte. (2) : Observation en microscopie à balayage d'une *S.* Enteritidis ayant adhéré à une cellule épithéliale et commençant l'induction de « membrane ruffling » ou boursoufflure membranaire. (3) : Membrane ruffling englobant *S.* Enteritidis. (4) : Une fois arrivée dans la lumière du gros intestin, *Salmonella* s'internalise dans les cellules de la paroi intestinale.

Une fois à proximité des cellules de l'hôte, les *Salmonella* spp. doivent pouvoir adhérer à la cellule. Ceci se fait par l'intermédiaire de protéines de surfaces spécifiques, les adhésines. Il en existe deux grandes familles : fimbriae et non-fimbriae (166–172). Ce sont des appendices protéiques de surfaces présents en plusieurs copies par cellule. Une étude sur le séquençage du génome de *S.* Typhimurium LT2 a montré qu'il existait 13 loci potentiels pour les fimbriae (172–174). Van der Velden *et al.* (175) ont étudié l'importance de cette diversité de fimbriae au sein de *S.* Typhimurium pour sa virulence complète chez la souris. Par contre, *in vitro*, *Salmonella* spp. exprime seulement deux opérons, celui du fimbriae de type I et celui des curli (173). Les fimbriae permettraient également une agrégation des bactéries lors du passage du tube digestif protégeant les bactéries des conditions environnementales rencontrées dans le tractus. Les adhésines non-fimbirae représentent un groupe plus hétérogène. Il est possible d'y retrouver des adhésines monomériques comme oligomériques pouvant être sécrétées par le système de sécrétion de type I (T1SS) ou autotransportées (167, 170, 171, 174, 176, 177). Elles se lient à la fibronectine de la matrice extracellulaire des mammifères (167, 170, 178–180).

Une fois la bactérie adhérée à la cellule hôte, des molécules effectrices sont injectées dans la cellule hôte par des systèmes de sécrétion de type III (T3SS) aussi appelés seringues moléculaires (**Figure 19**).

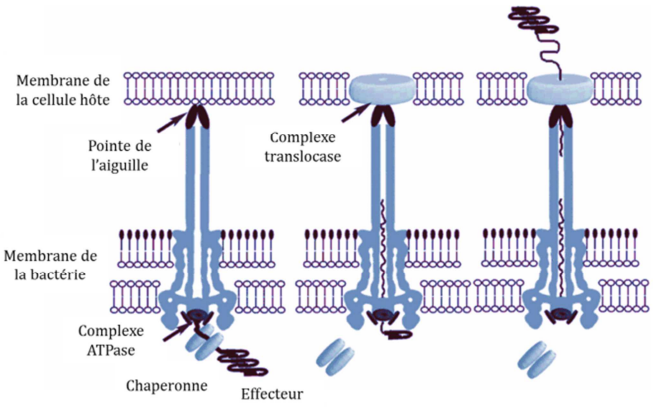

Figure 19 : Sécrétion d'une protéine dans la cellule hôte par le T3SS, d'après (181)

Ces systèmes sont responsables d'une sécrétion contact-dépendante de molécules impliquées dans la virulence à l'intérieur de la cellule hôte. Ils sont composés de quatre parties : l'aiguille, l'anneau externe, le cou et l'anneau interne, toutes constituées de diverses protéines. Par conséquence, les systèmes de sécrétion de type III constituent un tunnel pour le passage des molécules effectrices de la bactérie à la cellule hôte (171, 173, 178, 182–186). Les premières molécules qui sont sécrétées sont des molécules d'un complexe translocase (**Figure 19**) qui vont s'insérer dans la membrane de la cellule pour permettre le transfert des molécules suivantes dans la cellule (181, 186). Le T3SS de type 1 secrète les molécules clés pour l'internalisation

tandis que les molécules nécessaires pour la survie et la multiplication dans la cellule hôte sont secrétées par le T3SS de type 2, codé par le SPI-2.

La phagocytose induite, permettant à *Salmonella* spp. de s'internaliser dans des cellules hôtes non-phagocytaires comme les cellules épithéliales (**Figure 18 (4)**) fait appel à un mécanisme appelé « trigger mechanism » ou mécanisme de déclenchement. La mise en place de « membrane ruffling » (**Figure 18 (2) et (3)**), ou replis membranaires, est un mécanisme bien orchestré faisant intervenir deux évènements majeurs : l'activation d'une GTPase et la polymérisation de l'actine (**Figure 18 (4)**). Pendant cette étape, l'actine globulaire G est polymérisée pour ordonner l'actine F nécessaire pour l'internalisation de la bactérie (**Figure 18 (4)**). Ces mêmes effecteurs vont engendrer également la phosphorylation d'un récepteur d'un facteur de croissance épidural qui active une cascade de phosphorylation-déphosphorylation. Ceci va avoir pour conséquence l'augmentation de la perméabilité membranaire, ce qui résulte en l'accumulation de fluide et à l'apparition de la diarrhée. Ensemble, ces mécanismes vont permettre d'englober la bactérie et l'internaliser dans une vacuole, la SCV (*Salmonella* Containing Vacuole).

Une fois dans la SCV, il est important pour la survie de la bactérie de sécréter des effecteurs qui modifient les fonctions de la cellule hôte, comme la modification de la composition membranaire de la SCV (186, 187). De plus, des effecteurs impliqués dans l'étape d'internalisation jouent également un rôle dans le maintien de la SCV. Ils interférent avec les voies métaboliques en lien avec l'apoptose, pour en inhiber son issue, et permettre une maturation de la SCV ainsi que la multiplication des bactéries (186–193). Ainsi, elles se multiplient dans les cellules induisant une inflammation caractérisée par l'infiltration de neutrophiles ainsi que la présence de nécrose, d'œdème et la sécrétion de fluide (173, 182).

Une fois les *Salmonella* spp. dans la *lamina propria,* tissu conjonctif situé directement en dessous de l'épithélium intestinal, elles sont prises en charge par les macrophages ou les cellules dendritiques (**Figure 18 (4)**) (173, 182, 191, 194). Ceci permet leur dissémination dans l'organisme de l'hôte. Elles expriment plus de 40 protéines pour aider à leur survie dans le macrophage. Le macrophage contrôle la croissance intracellulaire des *Salmonella* spp. par l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la NADPH-oxydase dépendante de l'activité respiratoire. Cependant, *Salmonella* spp. produit des catalases, inactivant le H_2O_2 contenu dans le lysosome, mais aussi des superoxides dismutases (SOD), inactivant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et permettant ainsi de lutter contre le stress oxydatif provoqué par le macrophage. D'autres mécanismes se mettent également en place pour inhiber la fusion de la vacuole avec le lysosome du macrophage.

Avant de causer une infection, *Salmonella* spp. doit être capable de survivre à de nombreuses perturbations environnementales, comme l'acidité de l'estomac, les sels biliaires, les faibles

concentrations en oxygène, la pauvreté en nutriments, la présence de peptides antimicrobiens, le mucus et finalement les communautés microbiennes présentes dans le microbiote. Une fois dans le macrophage, la présence d'enzymes lysosomiques, la présence d'H_2O_2, la présence de radicaux libres ou encore les défensines induisent des stress supplémentaires. Par conséquent, un grand nombre de gènes est nécessaire à l'établissement d'une infection chez un individu hôte, y compris ceux impliqués dans la réponse aux stress (182).

2.4.1.2. Régulation de la virulence chez *Salmonella* spp. et son lien avec les perturbations environnementales

Chez la plupart des pathogènes, la virulence peut être attribuée à une partie unique du génome. Chez *Salmonella* spp., pathogène intracellulaire facultatif, le style de vie intracellulaire requiert un grand nombre de gènes distribués dans le chromosome (173, 182, 183, 195, 196).

En effet, l'évolution de *Salmonella* spp. est marquée par l'acquisition de nombreux « ilots de pathogénie » (93, 173, 195–199) par transfert horizontal de gènes notés SPI pour « *Salmonella* Pathogenicity Island », dont chacun contribue aux propriétés uniques de cette virulence (178, 195, 198). Ils peuvent être conservés à travers le genre *Salmonella* spp. ou alors spécifiques à certains sérotypes. Au total, 12 SPI sont connus (171, 178, 182, 183, 196, 200, 201), dont les plus étudiés sont SPI-1 et SPI-2 qui comportent des gènes impliqués dans l'internalisation et la multiplication à l'intérieur de l'hôte. Les autres SPI sont en lien avec l'infection systémique, la survie intracellulaire, l'expression des fimbriae (protéine de surface impliquée dans l'adhésion à la cellule hôte), la résistance aux antibiotiques, la production d'entérotoxines et la capture d'ions.

In vitro, les gènes contenus dans les SPI sont exprimés de façon maximale à 37°C, à pH neutre, à forte osmolarité et à partir de la fin de la phase exponentielle de croissance de *Salmonella* spp.. Ils sont régulés principalement par HilA (Hyper-Invasive Locus) sur SPI-1 qui code pour de nombreux gènes impliqués dans l'invasion de la cellule hôte et notamment les protéines constituant le T3SS (173, 181, 184, 185, 195, 202, 203). HilA est le régulateur principal des gènes de virulence. Des études sur des *ΔhilA* ont montrées que le phénotype induit par cette suppression était équivalent à une délétion complète de SPI-1. HilA active, entre autres, les opérons en lien avec le T3SS-1 en se liant directement au promoteur des gènes. De plus, il active également des opérons se trouvant sur les ilots SPI-4 et SPI-5 en présence d'autres produits du SPI-1. Dans certaines conditions, il réprime l'expression des gènes contenus dans SPI-2. L'expression de HilA en elle-même est contrôlée par d'autres activateurs qui sont HilC et HilD, codés par SPI-1, et RtsA codé par un ilot indépendant. HilE est quant à lui un répresseur de HilA. (173, 197, 204, 205).

La régulation de SPI-1 dépend fortement des conditions environnementales. Cet îlot est majoritairement exprimé dans des conditions semblables à celles rencontrées dans le tractus de l'hôte, à savoir les faibles teneurs en oxygène et une forte osmolarité. Il en est de même pour les autres SPI, comme le SPI-2 qui s'active pour de faibles osmolarités, de faibles concentrations en calcium et lors de l'acidification de l'environnement. Le SPI-2 encode 32 gènes dont la majorité est exprimée pendant la croissance dans la cellule hôte. Il code pour un système d'excrétion de type III, distinctement différent de celui codé par le SPI-1. Ces gènes vont notamment inhiber la fusion de la vacuole contenant *Salmonella* spp. et le lysosome tout en étant essentiels pour l'invasion systémique. Ainsi, il est possible de constater que l'activation de ces gènes dépend de la perception des changements environnementaux.

En effet, l'ensemble des régulateurs de la virulence est sous l'influence de systèmes à deux composants qui permettent de percevoir et de répondre à un changement environnemental, comme vu précédemment (**Figure 20**) (173, 205, 206).

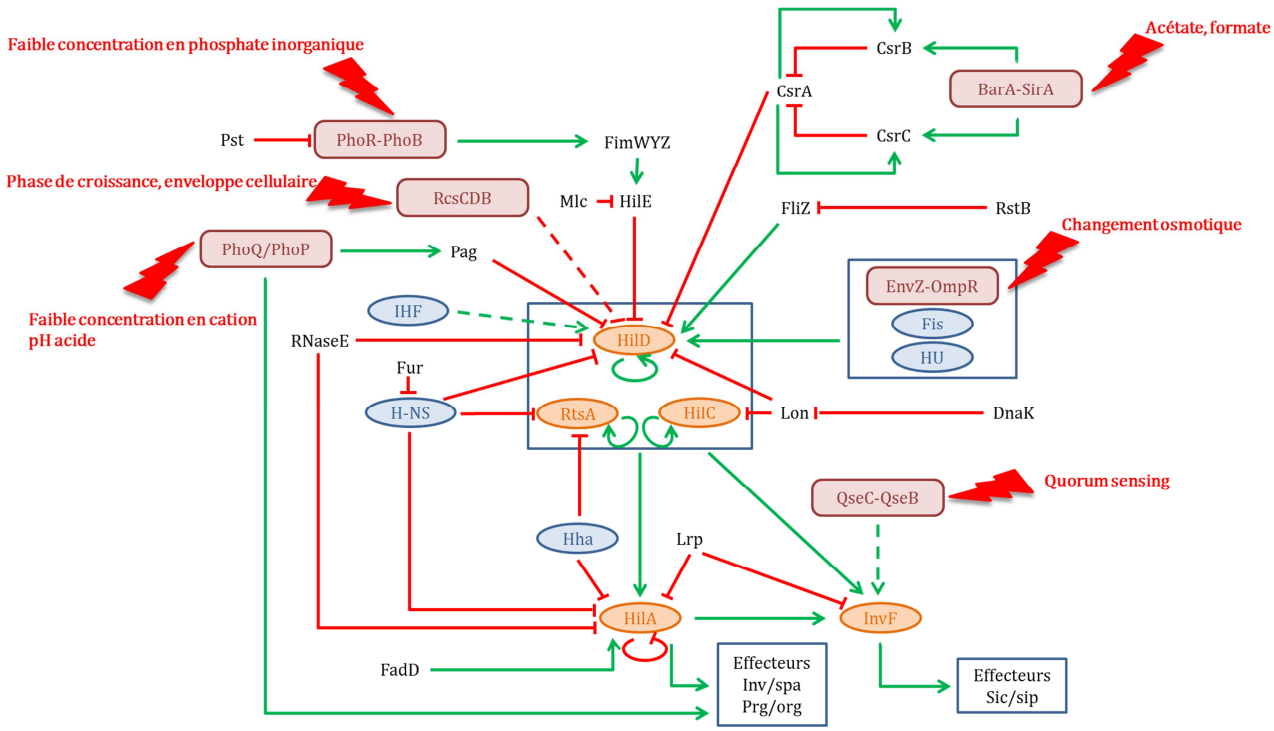

Figure 20 : Exemple de la complexité de la régulation de SPI-1 et l'impact de la perception de l'environnement sur cette régulation (173, 205)

Parmi eux, il est possible de retrouver le système EnvZ/OmpR, présenté en **section 2.2.2.**, impliqué dans la réponse aux perturbations osmotiques (**Figure 20**). OmpR jouerait un rôle sur l'expression de *hilC* et régulerait HilD de façon post-transcriptionnelle, eux-mêmes jouant un rôle sur HilA et donc sur l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la virulence. OmpR activerait également les gènes qui se trouvent sur le SPI-2 (173, 197, 205, 207). Comme présenté sur la **Figure 20**, d'autres systèmes à deux composants sont capables d'influencer des

régulateurs de la virulence, comme PhoR/PhoB (perception des faibles concentrations en phosphate inorganique), PhoQ/PhoP (perception des faibles concentrations en cations), BarA/SirA (perception des concentrations en carbohydrates) ou encore Qsec/QseB (perception des informations du quorum sensing). D'autres régulateurs sont également connus, comme les protéines associées aux nucléotides (NAP, nucleotid-associated proteins) qui sont très diverses et agissent en se liant à l'ADN en modifiant sa topologie. Par conséquent, l'accessibilité des promoteurs de certains gènes est modifié ce qui permet de réguler leur expression de façon positive ou négative (173, 205). Parmi eux, il est possible de retrouver le régulateur H-NS connu pour son implication dans la réponse au stress thermique et oxydatif. Il a été montré, dans le cas de la virulence, que le régulateur H-NS réprimait l'expression de HilA, HilD, HilC et de RtsA dans des conditions de non-induction. Par exemple, en absence de H-NS, une expression de HilA est observée. La répression par H-NS est très courante pour les gènes de virulence. Un exemple d'activation par H-NS concerne l'activation du gène codant pour le régulateur des gènes flagellaires (173, 205).

D'autres régulateurs contrôlent les processus de virulence comme Lon et DnaK qui sont des protéines HSP produites lors d'un stress thermique ou d'un séchage (voir **section 2, 2.2, 2.2.2.**) et qui influenceraient l'expression de SPI-1 ainsi que les gènes du flagelle (173). La protéine Fur, impliquée dans la réponse au stress oxydatif, réprimerait aussi H-NS, permettant ainsi l'activation de HilD (173, 197).

Pour finir, il a été montré que plusieurs facteurs sigma sont en lien avec la virulence, notamment σ^S et σ^E qui sont impliqués dans la réponse générale aux stress et à l'oxydation (102, 197, 206, 208).

De plus, l'ensemble des SPI s'articulent tous dans un phénomène de couplage réciproque dans le but d'orchestrer au mieux les mécanismes de virulence (173). Au regard de cette régulation de la virulence, il est évident qu'elle est influencée par les conditions environnementales. Par conséquent, il est possible que la virulence soit modifiée par les procédés industriels comme le séchage ou le traitement thermique (207).

2.4.2. La virulence chez *Cronobacter* spp.

A l'heure actuelle, la virulence de *Cronobacter* spp. n'est pas très bien connue. Une étude effectuée sur plusieurs souches de *C. sakazakii*, *C. muytjensii* et *C. malonaticus* montre qu'elles peuvent envahir différentes lignées de cellules humaines couramment utilisées dans les tests d'invasion (209). Il ressort également de cette étude que le pouvoir d'invasion est souche-dépendant. Il est remarquable qu'elles passent les couches de cellules Caco-2 et HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells), deux lignées cellulaires qui miment l'épithélium

intestinal et la barrière sang-cerveau. Ainsi, *Cronobacter* spp. est un genre de bactérie capable de transloquer à travers les épithéliums, comme *Salmonella* spp. (209). De plus, les cellules auxquelles *Cronobacter* spp. avait adhérées présentaient une condensation de l'actine sous la zone d'adhésion, montrant ainsi la capacité de cette bactérie à réarranger le cytosquelette de la cellule hôte (210). Il semble aussi que *Cronobacter* spp. puisse se multiplier dans le macrophage (211, 212), cependant, bien que les mécanismes de sa virulence ne soient toujours pas élucidés, quelques facteurs de virulence sont déjà été élucidés.

Les protéines de la membrane externe OMP (Outer Membranes Proteins) sont particulièrement intéressantes de par leur exposition sur la membrane externe mais aussi pour leur possible implication dans le transport de facteur de virulence, comme démontré chez *E. coli* (171). En effet, de nombreuses études montrent l'importance de OmpA lors de l'invasion de plusieurs types de cellules animales. Cette protéine permet, en effet, la création de microtubules entre la cellule hôte et la bactérie. Par exemple, dans la même étude testant les capacités d'invasion de différentes souches de *Cronobacter* spp., il est montré qu'il existe une forte hétérogénéité dans les séquences de *ompA*, ce qui pourrait être en lien avec l'invasion de cette bactérie (209, 213). En effet, une souche de *C. sakazakii ΔompA* est montrée comme ayant une virulence atténuée. Plus exactement, la protéine OmpA permettrait l'adhésion à la cellule hôte par l'intermédiaire de la fibronectine (210, 214). De plus, OmpX, une autre protéine de la famille des OMP, est aussi impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales. En effet, Kim *et al.* en 2010 montrent que l'invasion des cellules de lignée Caco-2 et INT407 est grandement affectée en l'absence des gènes *ompA* et/ou *ompX* (**Figure 21**).

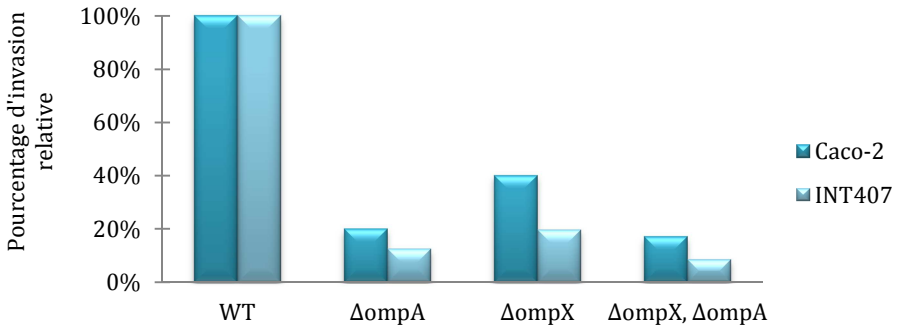

Figure 21 : Pourcentage d'invasion relative de *C. sakazakii* dans des lignées de cellules humaines Caco-2 et INT407 en fonction de la délétion du gène *ompA* et *ompX* codant pour des protéines membranaires (213)

La virulence de *C. sakazakii* est diminuée en l'absence de OmpA et OmpX, ce qui montre l'importance de ces protéines pour l'adhésion à la cellule cible. De plus, dans la même étude, il est conclu que ces deux protéines sont essentielles pour l'invasion apicale et basolatérale des cellules (191). Une étude de 2010 présente les différences génétiques entre des souches associées à des infections néonatales et des souches d'autres origines. Les souches associées à

des infections néonatales présentent des particularités vis-à-vis des réponses aux stress et disposent d'une adhésine putative (protéine de surface responsable de l'adhésion aux surfaces dont celle de la cellule hôte), présentant des similarités avec les adhésines d'autres bactéries à Gram négatif (212).

Les mécanismes de régulation de la virulence chez *Cronobacter* spp. ne sont toujours pas élucidés. Le système à deux composants EnvZ/OmR est présent chez *Cronobacter* spp. et joue un rôle dans la réponse au stress osmotique. L'étude de Ye *et al.* de 2015 montre que EnvZ est exprimée plus fortement dans une souche virulente que dans une souche atténuée (215). Il est donc possible que ce système intervienne également dans la régulation de la virulence chez *Cronobacter* spp.. Ainsi, cela laisse penser que, comme pour *Salmonella* spp., la virulence de *Cronobacter* spp. est en partie sous le contrôle de la perception environnementale et en lien avec la réponse aux stress. Du et al. (2015) montrent également qu'une surexpression des protéines chaperonnes est aussi détectée (216). Celles-ci seraient utiles dans le maintien des structures protéiques et joueraient un rôle dans l'adhésion cellulaire. C'est le cas de GroEL qui est une chaperonne de surface dont le rôle commence à être appréhendé chez d'autres genres bactériens.

Parmi les pathogènes retrouvés dans les produits secs, *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. sont deux bactéries à Gram négatif présentant un réel danger pour les consommateurs, en particulier les nourrissons. En effet, elles peuvent causer des gastroentérites nécrosantes voire des méningites néonatales à issue fatale. De plus, elles possèdent des mécanismes complexes d'acclimatation au séchage, ce qui contribue à leur forte résistance et persistance à l'état sec. Elles possèdent toutes les deux des mécanismes de virulence complexes qui ne sont pas complètement élucidés, mais un lien existe entre la perception des perturbations environnementales et les mécanismes de virulence. Le passage à l'état sec pourrait impacter la virulence de ce deux bactéries. Il est donc facile de concevoir, dans un premier temps, la nécessité de leur élimination dans les produits secs mais aussi, dans un deuxième temps, la difficulté de cette élimination. C'est pourquoi l'étude des conséquences des procédés de décontamination de ces deux bactéries est un point clé de leur optimisation. Notamment, ceci permettrait d'assurer la sécurité microbiologique des produits tout en conservant au maximum les propriétés organoleptiques des produits en respectant les attentes du consommateur.

3. La décontamination des produits alimentaires secs : un procédé complexe

Comme vu précédemment, *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. sont deux bactéries clés des produits alimentaires secs et notamment des produits infantiles. Selon le *Codex Alimentarius*, *Salmonella* spp. doit être « absente » des produits alimentaires, ce qui se vérifie par une énumération après enrichissement de 10 échantillons de 25 g et dans 60 échantillons de 25 g pour les produits infantiles. Pour *Cronobacter* spp., la législation est moins stricte et il n'est pas spécifiquement recherché dans les produits alimentaires excepté pour les produits infantiles ainsi que dans le cadre spécifique de l'alimentation des patients immunodéprimés où il doit être absent dans 30 échantillons de 10g. Pour assurer l'innocuité des produits alimentaires, plusieurs méthodes d'inactivation peuvent être appliquées.

3.1. Méthodes thermiques de décontamination

3.1.1. Problèmes fondamentaux de la décontamination thermique des produits secs

Dans le but de développer des méthodes thermiques adéquates, plusieurs informations sont nécessaires. En effet, il faut bien connaitre la thermorésistance des pathogènes cibles et également certains paramètres clés du produit à traiter comme l'activité et la mobilité de l'eau ou encore la nature et la composition du PS traité tout en préservant des propriétés organoleptiques et nutritionnelles définies comme la couleur, les vitamines ou encore les arômes.

3.1.1.1. Principe du traitement thermique

Le principe de décontamination thermique des produits consiste à modifier la température de l'environnement des bactéries pour les placer dans des gammes de températures supérieures à celles de leur condition physiologique. La température se propage du corps le plus chaud au corps le plus froid jusqu'à l'équilibre des températures. Les transferts thermiques s'effectuent selon trois modes : la conduction, la convection et le rayonnement. Dans le cadre des PS, le transfert de chaleur s'effectue généralement par conduction (diffusion de la chaleur au cœur des particules) et convection (brassage de la poudre dans un air chaud).

L'application de cette température peut se faire à différentes cinétiques et il en est de même pour le retour à la température initiale. Il est alors possible de parler de choc ou de rampe (**Figure 22**).

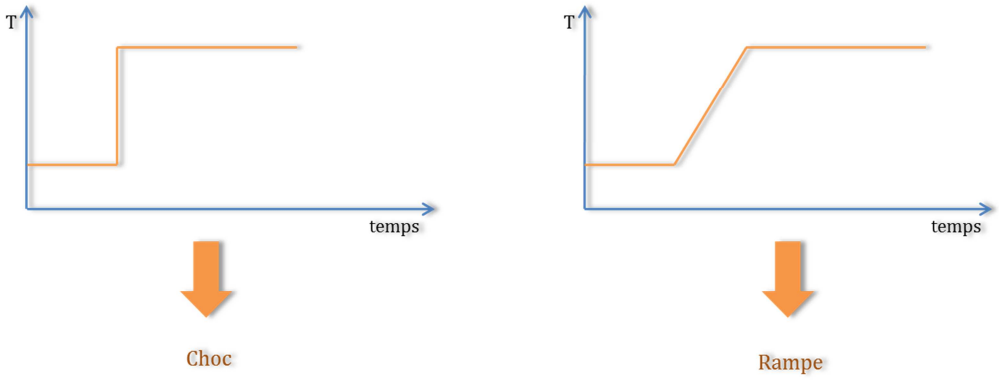

Figure 22 : Concept de choc et de rampe lors d'un traitement thermique

Le choc thermique est une variation brutale de la température tandis que la rampe thermique correspond à une variation lente de la température (**Figure 2**). Il a été montré, notamment dans les milieux liquides, que l'inactivation bactérienne était plus importante dans le cas d'un choc thermique que dans le cas d'une rampe.

Cependant, la cinétique en choc est difficilement applicable aux PS (solides ou poudres) ceci étant dû aux propriétés physiques de ce type de produits.

3.1.1.2. Propriétés physiques et chimiques des produits secs et leur contamination

Les produits alimentaires déshydratés peuvent se retrouver sous formes particulaires, comme par exemple la farine, les épices, les grains ou encore le lait en poudre. Ces particules ont souvent une forme irrégulière, souvent modélisées sous forme de sphères équivalentes pour les caractériser de façon simple (**Figure 23**).

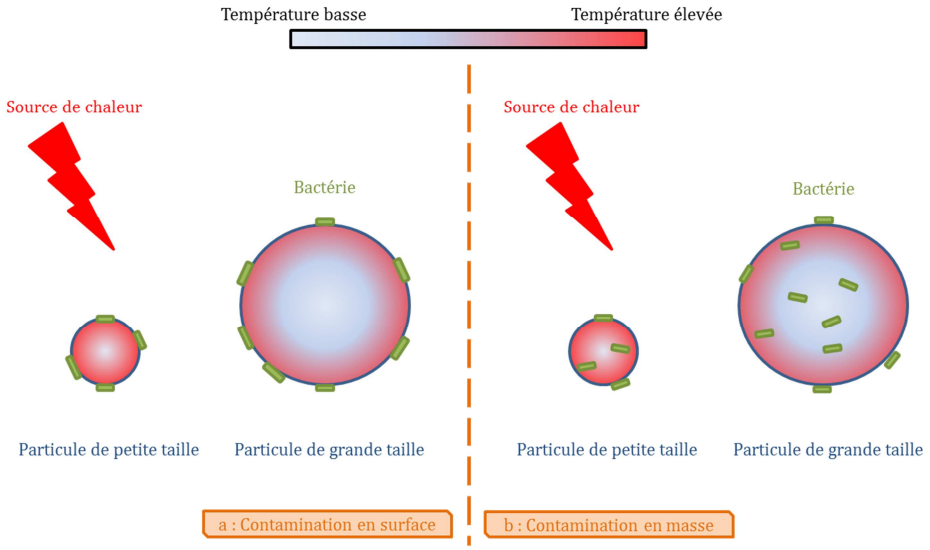

Figure 23 : Impact de la taille des particules et du type de contamination sur l'efficacité d'un traitement thermique de même intensité. En 1, la contamination de surface et en 2: la contamination en masse.

La contamination de ces produits peut être soit en masse (à l'intérieur des particules) soit en surface (en périphérie des particules). Par conséquence, lors d'une contamination en surface, les pathogènes vont se retrouver directement en contact avec la source de chaleur servant à l'inactivation bactérienne alors que, lors d'une contamination en masse, les pathogènes sont « protégés » de la source de chaleur et un certain temps est nécessaire pour que les particules chauffent à cœur et pour que le traitement soit efficace (**Figure 23**). Il apparait donc clairement que la distribution en taille des particules, ou granulométrie, dépend du type de PS étudié et la résistance thermique peut être différente selon les variations de structure du produit en question. Un temps plus grand et donc une quantité d'énergie supérieure sont nécessaires pour une contamination en masse par rapport à une contamination en surface afin de réduire la charge de pathogène de façon similaire. De même, la présence de grosses particules impliquera l'application de barèmes thermiques plus élevés que dans le cas d'une poudre à granulométrie fine.

De plus, de nombreux auteurs montrent l'importance de la composition chimique du produit, comme des produits riches en acide gras, en sucre ou en protéines, sur l'efficacité de l'inactivation bactérienne. Par exemple, dans des solutions à a_W réduite, l'utilisation de saccharose est favorable à la thermorésistante de *Salmonella enterica* contrairement au chlorure de sodium (217). L'effet de la teneur en matière grasse des produits sur la thermorésistance des microorganismes a été particulièrement étudié, notamment sur *Salmonella enterica*. Par exemple, dans des beurres de cacahuètes pour une même faible a_W, la thermorésistance est impactée par la teneur en lipides. Une bonne connaissance du produit alimentaire est une des clés de la sélection d'un traitement thermique adapté (29).

Plus spécifiquement, il est connu depuis longtemps que l'activité de l'eau d'un produit alimentaire est un facteur clé de l'inactivation bactérienne pendant un traitement thermique.

3.1.1.3. Le rôle de l'eau

Nous avons vu précédemment que les produits secs se caractérisaient par leur faible activité de l'eau. Or, de nombreuses études montrent l'influence de l'activité de l'eau sur les microorganismes et leur inactivation thermique. C'est notamment vrai pour *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp.. Par exemple, dans le cadre du traitement du beurre de cacahuète à 90°C, le fait de diminuer l'activité de l'eau de 0,60 à 0,20 induit une multiplication du temps nécessaire pour réduire la population de *Salmonella* spp. d'un facteur 10 par 2,35 (218). D'autres études, concernant une bactéries à Gram-positif , *Lactobacillus plantarum*, ou encore une levure, *Saccaromyces cerevisae*, sont aussi en accord avec ces observations (219–221).

Pour expliquer ce rôle de l'eau, deux effets antagonistes peuvent lui être imputés :

i. Rôle thermique de l'eau : Pour une même quantité d'énergie appliquée, la diminution de la quantité d'eau augmente la capacité du substrat et des microorganismes à s'échauffer et donc l'inactivation bactérienne mais ces produis sont entourés d'air, ce qui ralenti considérablement les transferts et contribue à l'hétérogénéité des traitements.
ii. Rôle structurant de l'eau : L'augmentation de la quantité d'eau permet une meilleure flexibilité des macromolécules favorisant leur dénaturation et donc l'inactivation bactérienne.

Comme nous l'avons vu, la flore de ces PS est acclimatée à ce type de produits et la faible mobilité moléculaire due à la faible quantité d'eau rend leur décontamination complexe.

3.1.2. Les techniques utilisées pour la décontamination thermique des produits secs

Les premières techniques de destruction des microorganismes ont été établies sur l'application de barèmes thermiques, avec des niveaux différents de température et de durée de traitement : pasteurisation (température comprise entre 62 et 88°C), stérilisation (température supérieure à 100°C) et la mise en conserve (température d'environ 121°C) (222). Encore aujourd'hui, la décontamination par des procédés thermiques est la méthode la plus utilisée. Même s'ils sont bien maitrisés, les traitements thermiques peuvent avoir des effets négatifs sur les propriétés nutritionnelles, organoleptiques et microbiologiques des produits. Par exemple, l'utilisation d'un choc thermique mal contrôlé peut augmenter la résistance à la décontamination (223–225). Bien que relativement efficace, les traitements conventionnels nécessitent souvent une longue période de montée et de descente en température, surtout concernant les produits alimentaires secs. En d'autres termes, un manque d'homogénéité réside et peut affecter les qualités du produit final. Cependant, le traitement thermique est connu depuis des années comme une méthode de préservation des produits alimentaires et ce depuis la préservation de viande contenue dans des bouteilles en verre mise au point par Nicolas Appert. Depuis cette période, de nombreux développements se sont opérés sur ce principe. Le traitement thermique des produits alimentaires permet de conserver certaines propriétés organoleptiques et de prolonger leur conservation.

La décontamination à la vapeur est un moyen simple et efficace pour décontaminer les produits alimentaires. C'est pour cette raison que industries utilisent surtout la vapeur saturée à l'heure actuelle. Cette méthode de décontamination peut utiliser la vapeur sous différentes formes :

i. La vapeur saturée sèche : Toutes les molécules d'eau sont sous forme gazeuse. Cette vapeur à une enthalpie maximale et évite l'humidification du produit.

ii. La vapeur saturée humide : Il y a présence de gouttelettes d'eau dans la vapeur. Son enthalpie est inférieure à celle de la vapeur saturée sèche et une étape de séchage après traitement peut être nécessaire.

iii. La vapeur surchauffée : c'est une vapeur sèche mais à une température supérieure à celle de la saturation de la vapeur d'eau (>100°C). Ainsi, les condensats sont réduits mais sa température est difficile à maitriser.

L'effet Joule, aussi utilisé dans certaines méthodes d'inactivation bactérienne, est la production de chaleur lors du passage d'un courant électrique dans un matériel conducteur. Pour un produit alimentaire sec, la méthode par effet Joule permet de s'affranchir des problèmes de transfert thermique et de surchauffe de la phase liquide. Le produit se fait par le passage d'un courant électrique dans le produit. Cependant, la conductivité électrique des produits à faible a_W reste faible et donc ce type de traitement est peu applicable à ce type de produits.

Il existe également des traitements par microondes et hautes fréquences consistant en l'exposition du produit alimentaire à des microondes ou à des ondes hautes fréquences. Ce procédé nécessite une teneur en eau d'au moins 10% et le temps de traitement reste court. Cependant, dans les PS, l'efficacité est réduite en plus du chauffage qui reste peu homogène.

Une autre méthode basée sur la détente instantanée contrôlée consiste à chauffer un produit sous forte pression et à le refroidir en faisant descendre la pression en dessous de 1 bar. Cette détente rapide engendre une rupture membranaire.

De même, la fluidisation à haute température consiste en la mise en contact du produit avec un air à température très élevée, pouvant aller jusqu'à 600°C, pendant quelques secondes avant un refroidissement rapide grâce à de l'air froid.

Lors de l'application de ces méthodes thermiques, il est important de noter qu'une élévation de la température est aussi à l'origine d'une variation de l'activité de l'eau du produit traité (221). Par conséquent, cela va modifier la thermorésistance de microorganismes au cours du temps de traitement (221). Pour permettre d'anticiper l'inactivation bactérienne ou choisir les paramètres de décontamination, il est possible d'utiliser des modèles prédictifs précédemment établis de façon empirique sur le produit alimentaire cible.

3.1.3. Modélisation des données de traitements thermiques pour obtenir des barèmes de décontamination

Un modèle peut être défini comme « la description d'un système, d'une théorie ou d'un phénomène qui rend compte de ses propriétés connues ou présumées et peut être utilisé pour une étude plus approfondie de ses caractéristiques ». En pratique, un modèle est souvent une

petite réplique d'un objet réel. Il constitue donc une description souvent simplifiée des relations entre les observations du système (réponses) et les facteurs qui sont soupçonnés d'influencer ces-dernières. Ainsi une observation peut être exprimée quantitativement grâce à des équations mathématiques. Par conséquent, un modèle mathématique peut simplement décrire des données ou également représenter une hypothèse ou une série d'hypothèses sous-jacentes à propos des relations entre les variables indépendantes qui conduisent aux observations. La première approche est souvent appelée un modèle « empirique », tandis que la seconde est décrite comme « mécaniste ». Chacune peut être utilisée pour prédire la réponse du système à des changements dans les variables (226).

Lors du traitement thermique, la charge microbienne diminue progressivement au cours du temps. Ainsi, de nombreuses études se sont penchées sur la modélisation de l'inactivation bactérienne dans les produits alimentaires (227). Les modèles les plus rencontrés sont le modèle linéaire et le modèle de Weibull.

Dans le modèle linaire, il est considéré que l'inactivation microbienne due à la température suit une loi du premier ordre (**Equations 3** et **4**). Pendant Δt à la température T :

$$N(t + \Delta t) - N(t) = -kN(t)\Delta t \quad (3)$$

$$\frac{dN(t)}{N(t)} = -kdt \quad (4)$$

Avec : k le taux d'inactivation en s^{-1}, N(t) la variation de la charge microbienne au cours du temps t, dt un petit intervalle de temps.

Ainsi, l'inactivation bactérienne est directement proportionnelle à la contamination du produit et en intégrant l'**Equation 3**, l'**Equation 4** est obtenue plus souvent exprimée en logarithme décimale (**Equations 5** à **9**) (227).

$$\int_{N_0}^{N(t)} \frac{dN(t)}{N(t)} = -k \int_0^t dt \quad (5)$$

$$ln\big(N(t)\big) - Ln(N_0) = -kt \quad (6)$$

$$N(t) = N_0\, e^{-kt} \quad (7)$$

$$N = N_0\, 10^{-t/D_T} \quad (8)$$

$$\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{-t}{D_T} \quad (9)$$

Avec : k le taux d'inactivation en s^{-1}, t le temps et N la charge microbienne au temps t, N_0 la charge microbienne initiale et D_T la réduction décimale à la température T avec $k = \frac{1}{D_T}$.

D_T représente le temps nécessaire pour réduire la population microbienne par 10 à une température donnée (**Figure 24**).

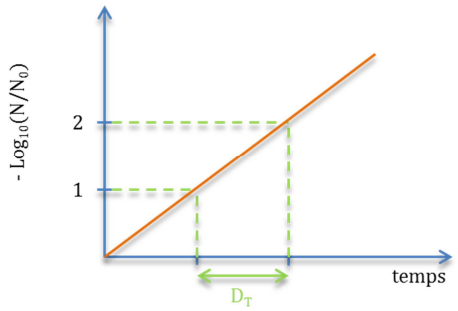

Figure 24 : Diminution logarithmique d'une population bactérienne à une température T donnée en fonction du temps de traitement et définition graphique de D_T

L'influence de la température sur le temps de réduction décimale peut être illustrée grâce à la loi de Bigelow permettant de définir un nouveau paramètre, z_T (**Equation 10**) (227).

$$D_T = D_{T_{ref}} 10^{\frac{(T_{ref}-T)}{z_T}} \quad (10)$$

Avec : T_{ref} la température de référence choisie, D_T et D_{Tref} les temps de réductions décimales obtenues (s) à T et T_{ref} (°C) et z_T représentent l'effet de la température (°C).

Plus exactement, z_T représente l'élévation de la température nécessaire pour diminuer D_T d'un facteur 10 (**Figure 25**).

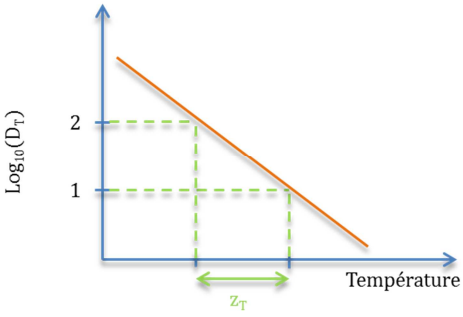

Figure 25 : Influence de la température sur D_T et définition graphique de z

Plusieurs valeurs de D_T et de z_T sont disponibles dans la littérature mais elles concernent surtout des produits aqueux et peu les PS. Le **Tableau 9** donne des exemples de valeur de D_T et z_T pour *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp..

Tableau 9 : Tableau présentant quelques valeurs de D et de z_T pour *Salmonella* spp. et *Cronobacter* spp. dans des milieux aqueux et des milieux à faible activité de l'eau

Microorganisme	Serovar	Milieu de traitement	aw	D_T	z_T	Référence
Milieu aqueux						
Salmonella spp.	Enteritidis	Œuf entiers liquide		D_{60} = 0,17 min	4,08°C	(228)
	Enteritidis	Jus de pomme		D_{55} = 0,53 min		(229)
	Typhimurium	Jus de pomme		D_{55} = 0,49 min		(229)
	Typhimurium	PBS		D_{58} = 0,4 min	5,7°C	(20)
Cronobacter spp.		PBS		D_{58} = 0,48 min	3,1°C	(20)
		Préparation infantile reconstituée		D_{58} = 0,50 min		(20)
		Préparation infantile reconstituée		D_{58} = 0,53 min		(21)
		Tampon phosphate citrate		D_{60} = 0,3 min	4,06°C	(230)
Milieu à faible activité de l'eau						
Salmonella spp.		Graine de cacao		D_{110} = 4,79 min	102,60°C	(231)
	Senftenberg	Bouillon avec glycerol	0,85	D_{60} = 3,3 min		(232)
	Typhimurium	Milieu glycerol	0,75	D_{57} = 8,8 min		(233)
	Senftenberg	Milieu glycerol	0,75	D_{57} = 41,5 min		(233)
	Typhimurium	Chocolat fondu		D_{70} = 816 min		(234)
	Senftenberg	Chocolat fondu		D_{70} = 440 min		(234)
	Weltevreden	Farine	0,25-0,30	D_{72-75}= 240 min		(234)
Cronobacter spp.		Milieu tamponné	0,96	D_{60} = 8 min	3,94°C	(230)

Il ressort de ce tableau que la valeur de D_T en milieu liquide pour *Cronobacter* spp. et *Salmonella* spp. est de l'ordre de 0,45 et 0,4 min. Respectivement, peu d'études se basent sur le calcul d'un D_T à faible activité de l'eau pour *Cronobacter* spp. mais pour *Salmonella* spp., il existe des données où il est possible de constater que la valeur de D_T est grandement augmentée. Par exemple, le D_{60} pour des *Salmonella* spp. dans les œufs entiers liquides est de 0,17 min mais dans un milieu glycérolé à 0,85 le D_{60} augmente jusqu'à 3,3 min. Ainsi, la valeur de D_{60} est multipliée par un facteur 19. Clairement, la modélisation permet également de comprendre aisément l'importance de l'activité de l'eau sur l'efficacité d'un traitement thermique.

Dans le modèle de Weibull, il est considéré que la destruction logarithmique ne suit pas une loi de premier ordre et que par conséquent, la diminution logarithmique suit la loi présentée par l'**Equation 11**.

$$\frac{N}{N_0} = e^{-(t/\alpha)\beta} \quad (11)$$

Avec : α le temps nécessaire à la première réduction décimale (analogue de D_T) et β un paramètre de forme

Cette loi est largement utilisée lors des cinétiques d'inactivation non linéaire. β va notamment jouer sur la forme concave ou convexe de la courbe (**Figure 26**).

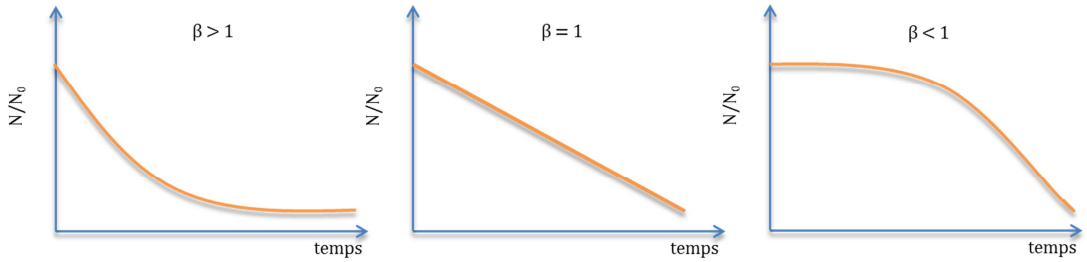

Figure 26 : Différentes courbes d'inactivation bactérienne modélisées par le modèle de Weibull en fonction de la valeur de β

Une valeur de $\beta > 1$ peut être rencontrée dans le cas où il y a un séchage en cours de traitement thermique, réduisant l'efficacité du traitement thermique. Quand $\beta = 1$, une destruction linéaire est observée comme dans le cas du modèle linéaire. Finalement, une destruction nécessitant un temps d'exposition avant d'être efficace va présenter une cinétique d'inactivation modélisée avec un $\beta < 1$.

L'utilisation de modèles prédictifs est courante dans les milieux aqueux mais ce n'est encore pas le cas dans les milieux à faible activité de l'eau. Quelques études sont focalisées sur l'établissement de valeurs de D_T et de z_T mais globalement un grand travail reste à fournir pour la prédiction de l'inactivation bactérienne dans les PS.

De plus, il serait possible d'envisager la modélisation de l'inactivation des bactéries comme un soutien à l'établissement de la validation de procédés. En effet, certains industriels valident leur étape de décontamination sur une chaine de fabrication pour s'assurer du bon fonctionnement de cette étape clé.

3.1.4. Validation de procédés de décontamination

La validation de procédés est une assurance qui certifie que l'étape décontaminante d'un procédé de fabrication assure la sécurité microbiologique du produit fini. Cette méthode a été proposée par la FDA (Food and Drug Administration), équivalent de l'Anses aux Etats-Unis. Elle est même rendue obligatoire dans le cadre d'un projet de loi aux USA. En effet, le FSMA (Food Safety Modernization Act), proposée par la FDA et accepté en janvier 2011, rend obligatoire cette étape de validation de procédé pour tous les producteurs des Etats-Unis et pour tous ceux exportant vers les Etats-Unis (235).

Les microorganismes substituts ou traceurs biologiques également appelés « surrogates » sont utilisés pour les études *in situ* de validation de procédés pour éviter d'utiliser directement le pathogène tout en assurant la sécurité de la ligne de production (236). Ces substituts doivent avoir certains critères proposés par la FDA (237) :

i. Non pathogène

ii. Caractéristique d'inactivation similaire au pathogène cible
iii. Comportement similaire au pathogène cible en fonction des paramètres du process
iv. Facile d'obtention
v. Génétiquement stable et susceptibilité aux traitements de décontamination identiques au pathogène cible

Ainsi, la validation par utilisation de substituts sera valable que dans des conditions prédéfinies pour un pathogène donné avec un produit donné (236). Cette validation par l'utilisation de traceurs biologiques est utilisée fréquemment en milieu à forte activité de l'eau. Par exemple, des *E. coli* de biotype I sont proposés par Cabrera-Diaz *et al.* (2009) pour jouer le rôle de substituts de *E. coli* O157 :H7 et 5 sérotypes de *S. enterica* (Agona, Anatum, Montevideo, Typhimurium et Senftenberg) dans le cas du traitement des surfaces de carcasses de bœuf par traitement thermique et acide (238). De même, il est connu que *Listeria innocua* est un traceur biologique pertinent pour *L. monocytogenes* dans les hamburgers (239).

Cependant, à l'heure actuelle, peu de traceurs biologiques sont disponibles dans la littérature pour les pathogènes des produits alimentaires déshydratés. En effet, deux traceurs biologiques pour *S.* Enteritidis sont utilisés dans ce type de produit : *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 et *Pantoea agglomerans* SPS2F1. Ils ont été initialement étudiés dans le cas du traitement thermique des amandes par extrusion et par grillage, la souche la plus utilisée étant *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 (240–245). Cependant, elle est utilisée couramment mais un grand travail reste faire pour garantir l'innocuité des produits alimentaires secs et pour les divers types de traitements thermiques. De plus, l'adéquation de cette souche aux critères de la FDA reste encore un point de discussion. Etant une bactérie à Gram positif et *S.* Enteritidis une bactérie à Gram négatif, les conséquences des traitements de décontamination et, par conséquent, les lésions dues à ces traitements seront certainement différentes. De plus, dans certains pays, l'espèce *E. faecium* étant classée comme pathogène de niveau deux, elle n'est pas utilisable *in situ*.

Ainsi, un grand travail reste à mener pour déterminer d'éventuels traceurs biologiques remplissant le cahier des charges de la FDA (6). Cependant, pour cela, il est nécessaire de comprendre comment agit le traitement thermique sur les cellules végétatives afin de choisir les traceurs biologiques les plus fiables, par exemple présentant les mêmes causes de mort cellulaire que les pathogènes et avec une sensibilité supérieure ou égale.

3.2. Impact des traitements thermiques sur les cellules bactériennes végétatives

Nous avons vu que les traitements thermiques sont couramment utilisés dans le cadre de la décontamination des produits secs. Pendant ces procédés, l'inactivation bactérienne est influencée par plusieurs facteurs, comme le type de milieu, les conditions de croissance, le mode de traitement thermique ou encore le type de microorganismes. L'optimisation de ces traitements passe par la compréhension de l'impact du stress thermique sur les microorganismes. Tous les composants cellulaires peuvent être potentiellement affectés, à différents degrés, par des températures élevées. De plus, une meilleure connaissance des mécanismes de mort cellulaire et de l'impact des traitements thermiques sur les cellules bactériennes permettrait d'en optimiser les conditions pour en augmenter l'efficience.

3.2.1. Effet de la température sur les membranes

L'une des principales causes de mort cellulaire provoquée par stress thermique est la perte d'intégrité membranaire. Il a été vu précédemment que la membrane des bactéries est le siège du transfert de molécules d'intérêt vers ou depuis le milieu extérieur. C'est aussi le lieu de la respiration cellulaire avec la présence de la chaine de transporteurs d'électrons permettant la production d'ATP.

L'altération de la paroi bactérienne chez les Gram négatives peut se faire à trois niveaux : sur la membrane externe, le peptidoglycane et sur la membrane interne.

Les dommages sur la membrane externe apparaissent à des températures relativement faibles. Des changements morphologiques et structuraux sont observés. Il y a également une perte des lipopolysacharrides. La perméabilité est ainsi altérée (**Figure 27**) ayant pour conséquence une évasion des protéines périplasmiques ou encore la rentrée de composés nuisibles (246, 247). Par exemple, sur la photo ci-dessous, l'impact du traitement thermique à 47°C en milieu liquide sur la membrane externe de *Cronobacter sakazakii* est observé par microscopie électronique à transmission.

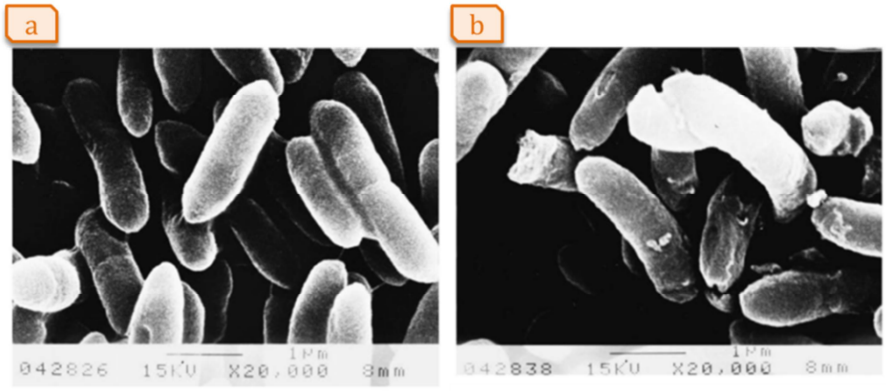

Figure 27 : Altération de la membrane externe de *Cronobacter sakazakii* observée au microscope électronique à balayage avant (1) et après (2) stress thermique à 47°C pendant 15 min dans du tampon phosphate (248)

La membrane interne est plus sensible à la chaleur que la membrane externe. Les dommages dus à la chaleur perturbent les fonctions biochimiques et de transport de la membrane interne (246). La température induit un changement de potentiel membranaire. Ce changement est en fait une dépolarisation qui dépend de la température et du temps d'exposition. La perméabilisation de la membrane en est une conséquence qui donne une indication du niveau d'altération de la membrane suite à un traitement thermique.

Les lipides membranaires jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité membranaire et de sa fluidité. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ils sont plus ou moins sensibles à la température. En fonction du ratio acides gras saturés / acides gras insaturés, la membrane a une fluidité différente et donc une sensibilité différente au traitement thermique. Les acides gras saturés permettent une meilleure préservation de l'intégrité membranaire pour des températures élevées. Par exemple, la température de croissance de *Salmonella* spp. modifie la composition en acide gras des membranes (249, 250). Ainsi, après une croissance à 25°C la composition membranaire en acide gras présente un plus fort pourcentage d'acides gras insaturés qu'après une croissance à 42°C. En effet, dans l'étude de Yang et al. (2014), à 25°C, la membrane de *S.* Enteritidis contient 35,98% d'acides gras C16 :1 et 7,35% d'acides gras C16 :1 contre 46,39% d'acides gras C16 :1 et 1,09% d'acides gras C16 :1 à 42°C. De façon plus globale, à 25°C la proportion d'acides gras insaturés totale est de 19,84% et de 43,71% pour les acides gras insaturés contre 2,66% et 60,6% à 42°C. Cette différence de composition impacte directement l'efficacité du traitement thermique ; la croissance à 42°C et donc une composition membranaire plus riche en acides gras saturés est favorable à la survie au traitement thermique (249). Ce phénomène est également observé chez *Cronobacter* spp. (251). Ceci peut s'expliquer par le fait que la température induit des mouvements moléculaires et des changements de saturation des acides gras.

Cette agitation moléculaire va engendrer une perte de l'intégrité de la membrane due à sa trop forte fluidité. C'est également cette augmentation de fluidité qui engendre une réponse au stress thermique dans un milieu liquide ou à forte activité de l'eau (252–254).

En milieu liquide, cette perméabilité membranaire va conduire à un relargage d'ions. Dans un premier temps, la membrane devient plus perméable aux ions H^+ et par conséquent la bactérie va mettre en place des canaux thermosensibles couplés à une activité ATPase permettant de lutter contre l'acidification du cytosol observé lors d'un stress thermique. De plus, la membrane étant le siège d'activités vitales, dont la respiration, une modification de la structure induira un dérèglement des processus vitaux pour la bactérie.

Cependant, dans des milieux secs, peu d'études s'intéressent à l'impact du traitement thermique sur la perméabilité membranaire et ses conséquences. Il semble peu probable qu'autant de mouvements moléculaires se produisent à des activités de l'eau très faibles. L'impact de stress thermique sur la physiologie bactérienne à l'état sec reste donc à comprendre.

Un autre effet d'un stress thermique ou d'une décontamination thermique sur les bactéries est une dénaturation des protéines qui sont vitales pour les différentes activités métaboliques.

3.2.2. Effet de la température sur les protéines

Les protéines sont des molécules vitales pour le bon fonctionnement cellulaire. Cependant, soumises à de fortes températures, une perte de conformation ou dénaturation peut se produire à cause de la rupture des liaisons essentielles au maintien conformationnel.

En effet, les liaisons hydrophobes et les ponts disulfures sont sensibles à une température d'environ 100°C. Ainsi, lors d'un stress thermique, ces liaisons sont détruites et les protéines perdent leur conformation et donc leur fonction. De plus, de nombreuses protéines membranaires sont sensibles aux changements de la composition lipidique locale de la membrane. A très forte température, les protéines s'agrègent et une forte corrélation est observée entre l'évolution de la dénaturation des protéines et la perte de viabilité d'une bactérie (246). Globalement, si les protéines impliquées dans des processus vitaux sont dénaturées, il est concevable que la survie de la bactérie soit engagée. Cependant, nous avons vu en **section 2.3** que les bactéries séchées possédaient un pool de HSP produites pendant la dessiccation. Ces protéines préviennent de la dénaturation protéique due au stress thermique en maintenant la conformation des protéines. De plus, la faible mobilité moléculaire maintient la fonctionnalité des protéines. De même, les osmoprotectants joueraient un rôle dans la protection des structures protéiques durant le stress thermique. En effet, il est reconnu que chez *Salmonella* spp., le tréhalose joue un rôle protecteur durant un stress thermique (110).

Ainsi, avec les lésions causées à la membrane, la dénaturation des protéines peut être une des causes de la mortalité bactérienne. De plus, la machinerie cellulaire peut être affectée au niveau des acides nucléiques.

3.2.3. Impact d'un stress thermique sur les acides nucléiques

Les acides nucléiques se retrouvent dans l'ADN qui est stable. Il faut une température très haute pour causer des ruptures de liaisons entre les bases. Les ARN sont plus sensibles à la température. Cependant, il est admis que la dénaturation de l'ADN ou des ARN n'est pas la cause principale de l'inactivation bactérienne pendant un traitement thermique (255). Une interaction entre les différentes causes de mortalité cellulaire est souvent observée. De plus, un grand nombre d'études concerne la compréhension des phénomènes de mort cellulaire due au stress thermique mais peu se focalise sur les phénomènes impliqués à l'état secs.

Devant la complexité de la décontamination par traitement thermique, les industriels se sont penchés sur d'autres techniques de décontamination des produits secs.

3.3.Les autres méthodes et leurs limites

L'inactivation des pathogènes par des méthodes thermiques étant souvent compliquée dans les milieux à faible activité de l'eau, de nombreuses méthodes alternatives ont été développées.

L'irradiation est une méthode efficace de décontamination des PS. De plus, elle permet leur conservation sur de longues périodes et, pour des applications spéciales, elle permet également de stériliser complètement le produit. L'irradiation agit en hydrolysant les molécules d'eau disponible dans le produit alimentaire en ion hydrogène H^+ et HO^- et aussi en générant des espèces réactives de l'oxygène, telles que les radicaux hydrogène H• et hydroxyle HO•. Cependant, dans les PS la cible de l'irradiation reste l'eau, même si elle est minoritaire, et réduit les chances de rencontre des espèces réactives avec les microorganismes, expliquant la forte dose d'irradiation nécessaire pour assurer la qualité microbiologique par cette voie (222, 256–258). Parmi les techniques impliquant l'irradiation, l'irradiation par rayon gamma a longtemps été perçue comme le meilleur traitement de décontamination des produits alimentaires. Cette méthode consiste en l'exposition à des photons, ayant une haute perméabilité au produit. La stérilisation des aliments exige une dose beaucoup plus importante de rayons gamma (10-50 kGy) qu'une décontamination. En raison de l'énergie de rayonnement, la formation de radicaux libres hautement réactifs est observée. De nouvelles molécules pourraient donc apparaître, par exemple, l'irradiation des lipides provoque la formation de cyclobutanones dont la toxicité est avérée. Elle peut également induire la perte ou la dégradation de certains acides aminés et de certaines vitamines, comme les vitamines A, B1, B6, B12, C, E, K, en fonction de la dose et la radiosensibilité des molécules. En plus de ces aspects scientifiques et techniques, l'irradiation au

rayon gamma est souvent rejetée par le consommateur, souffrant d'une opinion publique très mauvaise en raison de la confusion entre le rayonnement et la radioactivité. L'irradiation par rayon X consiste en l'exposition à des photons. Ils ont une haute perméabilité au produit. Ce traitement est également très efficace mais l'efficacité reste faible (5-10%) pour les PS. Enfin, l'irradiation par faisceau d'électrons consiste en l'exposition à des courants d'électrons possédant une forte énergie cinétique produite par des accélérateurs cyclotrons. L'énergie est délivrée sur une très courte durée (environ 5 s) qui peut être répétée pour assurer un bon traitement. Cependant, la perméabilité est faible avec une hauteur de produit traité de 6 à 8cm, en général.

La méthode par fumigation consiste en l'application de gaz engendrant des réactions d'alkylation provoquant l'inactivation des bactéries présentes. L'utilisation de gaz spécifiques, tels que l'éthylène ou l'oxyde de propylène est pratiquée depuis longtemps à température ambiante. Néanmoins, les normes sont de plus en plus strictes et les molécules résiduelles dans le produit traité sont connues pour être carcinogènes. Ils ont tendance à être donc totalement interdits comme l'oxyde d'éthylène qui a été interdit en France depuis 1990 (222). La liste de gaz actuellement autorisés pour de telles méthodes est aujourd'hui très réduite. Bien que son efficacité soit variable, l'ozone a également été envisagé pour de tels traitements car il provoque une oxydation forte des molécules vitales de la cellule (259).

La décontamination par les procédés haute pression (High Pressure Processing, HPP) est généralement considérée comme agissant sur les membranes en nuisant à leur intégrité, leur fluidité, leur capacité à échanger des ions et également sur la fonctionnalité de certains enzymes ou protéines vitales. L'inactivation bactérienne par HPP dépend de plusieurs paramètres comme le type de bactérie, le niveau de pression, la composition du milieu de traitement ou encore les modalités du couple temps-température pendant le traitement. La composition du produit à décontaminer est aussi importante, certains composants comme les acides gras ayant un effet protecteur (260). L'effet pasteurisateur des HPP n'est cependant efficace que pour les milieux aqueux dû à la compressibilité de l'eau. De ce fait, l'utilisation des HPP n'est pas envisageable pour les PS. Une récente étude montre cependant l'efficacité de la pression pour la décontamination de spores bactériennes sèches grâce à l'utilisation d'un gaz vecteur (261). L'application industrielle de cette méthode ne parait néanmoins pas possible.

Enfin, la décontamination par lumière pulsée consiste en l'application de flash lumineux de forte intensité de façon répétée. Cette méthode est très efficace pour les produits transparents mais son impact est réduit dans les produits opaques pour lesquels seule la surface est décontaminée.

La faible présence d'eau complique leur décontamination, comme dans le cas du traitement thermique. Cependant, ce dernier profite d'un historique, d'un coût faible et d'une maîtrise importante en faisant une méthode de choix privilégiée par les industriels et les consommateurs.

En Europe, la destruction des microorganismes dans les milieux alimentaires à faible a_W se fait actuellement principalement par l'application de traitements thermiques. Cependant, la réalisation de ces traitements se fait encore essentiellement de façon empirique et n'intègre pas les propriétés physico-chimiques du produit comme l'a_W. Les faibles activités de l'eau caractérisant les produits secs augmentent grandement la thermorésistance des microorganismes. Par ailleurs, les transferts thermiques sont ralentis par la substitution de l'eau par l'air qui contribue aussi à l'hétérogénéité de ces milieux. La modélisation empirique de données d'inactivation permettrait de fournir des barèmes de décontamination comme c'est déjà réalisé pour les produits alimentaires aqueux. De plus, ces modèles pourraient être d'un grand soutien dans le cadre de la validation des procédés de décontamination. Par ailleurs, la conséquence des traitements thermiques sur la physiologie et la fonctionnalité des cellules végétatives est bien appréhendée dans les milieux liquides contrairement aux milieux secs. Une telle compréhension aiderait à optimiser des traitements thermiques dans ces produits.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

A la suite de cette analyse bibliographique, il ressort que, bien que très surveillée, la qualité microbiologique n'est pas toujours assurée et ce qui se manifeste par de nombreux rappels de produits et de TIAC. Parmi les pathogènes incriminés, *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp. sont de première importance pour la sécurité des nourrissons. Ces bactéries possèdent des systèmes de virulence reliés à la réponse aux stress environnementaux. Or, sur des produits secs, elles ont subi un séchage, combinaison d'un stress osmotique et oxydatif, qui pourrait augmenter cette virulence. De plus, ce séchage joue aussi sur la mise en place d'une protection croisée à d'autres stress comme le stress thermique. Cependant, la décontamination par la chaleur est encore la méthode de décontamination la plus utilisée ainsi que la plus acceptée par les industriels et les consommateurs. Bien que très étudié, connu et maitrisé en milieu aqueux, en milieu sec ce procédé est encore très empirique et dépend beaucoup de la nature du produit. Jusqu'à présent, très peu de modèles permettent de caractériser l'inactivation bactérienne dans les PS et aucun n'intègre l'activité de l'eau comme un facteur clé de l'optimisation de l'inactivation bactérienne. Par ailleurs, les mécanismes en lien avec la mort cellulaire dans ces produits sont peu étudiés bien qu'une meilleure compréhension de ces phénomènes et du rôle spécifique de l'activité de l'eau sur ces derniers permettrait d'optimiser les traitements thermiques de décontamination des poudres alimentaires. De plus, de par le lien entre la virulence et la réponse au stress il est intéressant de se demander si le fait de transformer et de traiter les produits secs n'engendrerait pas un risque accru pour le consommateur, ce qui, à l'heure actuelle, n'est toujours pas démontré pour ces produits.

Ce travail de thèse a pour but de rationaliser l'utilisation de procédés de traitements thermiques destiné à la décontamination de produits secs, notamment à travers la compréhension du rôle spécifique de l'activité de l'eau dans les milieux considérés. Cette compréhension doit permettre de construire et d'utiliser des modèles théoriques adaptés à cette inactivation. De plus, grâce à cette approche, il sera possible d'identifier des traceurs biologiques potentiels pouvant mimer le rôle de *Salmonella enterica* et *Cronobacter* spp. dans les conditions testées dans cette étude, ce qui peut permettre de remplacer les traceurs utilisés actuellement et dont la fidélité est, aujourd'hui, source de débat.

Pour ce faire, l'étude s'est appuyée sur deux espèces pathogènes : *Salmonella enterica* (deux sérotypes différents, Typhimurium et Senftenberg, de la sous-espèce *enterica*) et *Cronobacter sakazakii*. Comme dans la plupart des produits secs, ces bactéries insérées dans un support modèle ou alimentaire vont d'abord être déshydratées avant d'être soumises à un traitement thermique puis finalement, réhydratées. Ces trois phases distinctes (séchage, traitement thermique et réhydratation) sont étudiées dans l'objectif d'optimiser l'inactivation de trois

pathogènes classiques de ce type de milieux. Les différents chapitres de ce travail de thèse ont visé à répondre à différentes questions soulevées par l'étude bibliographique :

- Quelles sont les conditions de séchage permettant d'optimiser l'inactivation ou la survie bactérienne ?
- Quel est l'impact de la réhydratation sur l'inactivation des bactéries pathogènes à l'état sec ?
- Quel est l'impact d'un traitement thermique à l'état sec sur l'inactivation bactérienne et quelle modélisation peut être proposée pour prendre en compte l'importance de l'activité de l'eau ?
- Quels sont les impacts du séchage et du traitement thermique successif sur la membrane ou les enzymes des bactéries étudiés ?
- Quelles sont les conséquences d'un séchage et d'un traitement thermique successif sur la virulence des bactéries étudiées ?

Pour répondre à ces questions, les méthodes de microbiologie classique ont permis d'obtenir l'impact des conditions de séchage, de réhydratations et de traitement thermique sur l'inactivation bactérienne en fonction des différentes conditions testées, dont l'activité de l'eau. Des analyses en cytométrie en flux ont permis d'observer l'impact de ces stress sur l'intégrité membranaire ainsi que sur l'activité enzymatique. Finalement, des études sur des cellules Caco-2, représentatives de l'épithélium intestinal humain, nous ont permis de voir si le séchage et le traitement thermique à l'état sec avaient un impact sur l'internalisation et la multiplication à l'intérieur de la cellule hôte, phénomènes prenant place lors d'un cycle infectieux.

Chapitre 1

Impact des Conditions de Séchage sur l'Inactivation de Microorganismes Pathogènes

1. Introduction

Salmonella enterica et *Cronobacter sakazakii* sont deux bactéries impliquées dans un grand nombre de TIAC. La première cause plus de 100 000 cas par an en Europe. La deuxième est particulièrement dangereuse pour les nourrissons, avec un taux de mortalité allant jusqu'à 80% (8). Au cours des dernières années (1986-2012), plusieurs cas d'infection à ces deux bactéries mettent en cause du lait en poudre ou des préparations à base de lait en poudre (8, 74, 85, 86, 262, 263). Ces produits, non stériles, sont séchés jusqu'à atteindre des niveaux d'activité de l'eau compris entre 0,25 et 0,60, garantissant leur conservation. Par conséquent, des bactéries contaminantes peuvent se retrouver à l'état sec sur ce type de produits.

Il est reconnu que les microorganismes sont très résistants aux procédés de décontamination à l'état sec (219, 220). Cette résistance particulière est en grande partie attribuable d'une part à la faible mobilité moléculaire induite par le retrait de l'eau et, d'autre part, à la réponse intégrée au stress mise en place par les cellules. Ceci explique pourquoi l'inactivation des pathogènes dans les aliments à faible a_W est compliquée à réaliser. Des travaux précédents dans le laboratoire ont déjà montré que le séchage peut contribuer à l'inactivation bactérienne (147, 264). Ce chapitre vise à comprendre les effets des paramètres de séchage sur *Salmonella enterica* et *Cronobacter sakazakii*.

Les objectifs de ce chapitre sont les suivants :

- Comprendre l'impact de l'évolution de l'activité de l'eau sur la cultivabilité des pathogènes alimentaires lors d'un séchage
- Optimiser les conditions de séchage pour conserver un maximum de viabilité pour permettre la réalisation de traitements thermiques successifs sur des pathogènes secs
- Optimiser les conditions de séchage pour maximiser l'inactivation bactérienne et permettre l'utilisation du séchage comme un procédé supplémentaire de décontamination

Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique accepté dans le journal *Food Microbiology* : LANG, E., IACONELLI, C., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P. (2015). **Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk.** DOI : 10.1016/j.fm.2016.10.005

2. Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk

LANG, E., IACONELLI, C., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, J.M. AND GERVAIS, P.

2.1. Abstract

Salmonella Typhimurium and *Cronobacter sakazakii* are two foodborne pathogens involved in neonatal infections from milk powder and infant formula. Their ability to survive in low-moisture food and during processing from the decontamination to the dried state is a major issue in food protection. In this work, we studied the effects of the drying process on *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*, with the aim of identifying the drying parameters that could promote greater inactivation of these two foodborne pathogens. These two bacteria were dried under different atmospheric relative humidities in milk and phosphate-buffered saline, and the delays in growth recovery and cultivability were followed. We found that water activity was related to microorganism resistance. *C. sakazakii* was more resistant to drying than was *S.* Typhimurium, and milk increased the cultivability and recovery of these two species. High drying rates and low final water activity levels (0.11–0.58) had a strong negative effect on the growth recovery and cultivability of these species. In conclusion, we suggest that effective use of drying processes may provide a complementary tool for food decontamination and food safety during the production of low-moisture foods.

2.2. Keywords

Salmonella Typhimurium, *Cronobacter sakazakii*, Cultivability, Milk, Drying conditions

2.3. Introduction

Salmonella enterica is a Gram-negative, facultative anaerobic, motile, nonspore-forming bacterium that causes human salmonellosis. It is a major pathogen in the food industry and is highly represented in outbreaks across the world, with nearly 100,000 cases reported every year in the European Union. Because of 10^5-10^{10} cells in adults and few microorganisms in young children and elderly people (10–100 cells) cause illness, the bacterium is important in food safety and the food industry, and must be eliminated from food products(88, 182). *Cronobacter sakazakii*, another Gram-negative, facultative anaerobic, motile, and nonspore-forming bacterium, is considered an opportunistic pathogen that can cause severe infections such as meningitis, bacteremia, and necrotizing enterocolitis in infants. However, the infective

dose is not well defined and the incidence of this bacterium is largely underestimated. Death rates in *Cronobacter* infections are up to 80% and *Cronobacter sakazakii* contamination is another important issue for the infant formula industry (265).

In recent years, some reported cases have involved the presence of these two pathogens in infant formula or milk powder (8). Milk is pasteurized and then spray-dried to provide the low water activity (a_W) of 0.35–0.25 needed to preserve the nutritional, organoleptic, and microbial qualities over time (8). However, milk contamination can occur during the transfer to spray-drying and during handling of dried milk (234). This is reflected by outbreaks involving *Cronobacter* spp., such as 3 cases in 1986 in Iceland, 4 cases in 1988 in the USA, 12 cases in 1998 in Belgium, 11 cases in 2001 in the USA, 3 cases in 2004 in France, 2 cases in 2008 in USA, and 4 cases in 2011 in USA. Examples of outbreaks involving *Salmonella enterica* include 3,000 cases in 1976 in Trinidad, 76 cases in 1986 in the UK, 141 cases in 2005 in France, 42 cases in 2008 in Spain, and 16 cases in 2012 in Russia. These outbreaks involved contamination of powdered infant formula or milk powder, which are low-moisture foods (8, 74, 85, 86, 262, 263).

These two bacteria are found in a large range of food products and in the food industry environment (8, 43, 265–268). a_W is a thermodynamic parameter that reflects the water availability in the environment and can affect every system involving water such as the biochemical, biological, and physiological reactions. . Bacteria have many active mechanisms, involving the activation of several resistance pathways, including sugar and amino acid accumulation, scavenger enzyme production, DNA repair, and other protein production processes, to resist dehydration caused by a change in environmental conditions, including preventing or repairing damage (17, 19, 24, 99, 100, 102, 104, 110, 269).

Passive physical reactions take place as water exits cells during drying. The osmotic pressure increases during the first decrease in a_W through to the end of the liquid state, and oxidative stress may occur in response to the cell's exposure to an oxygen-containing atmosphere (101). Below an a_W threshold of $\sim$ 0.90, active bacterial responses no longer occur because of the low molecular mobility and bacterial metabolism (19, 99, 100). The preserved molecules needed for bacterial metabolism and cell viability may differ according to the damage caused. Thus, determining the viability by measuring cultivability may be a restrictive way to evaluate bacterial functionality after drying (102, 270).

Microorganisms are more resistant to the thermal decontamination process when in the dried state compared with the liquid state (14, 155, 219, 220, 271, 272). This particular resistance is largely attributed to the low molecular mobility (273, 274), and also to the cross-protection occurring during the transition to the dried state (24, 86, 151). Inactivation of pathogens in low-a_W food is too complicated for accurate prediction because of the complex effects on cultivability

(86, 221). Because the drying process is involved in causing bacterial death, drying may be a potential kill step during the handling of dried products.

Because of the danger for infants and the difficulty in eliminating, in dried state, bacterial pathogens such as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*, the drying process is an important step in the control of these pathogens. From this perspective, this study aimed to understand the effects of drying parameters on these two pathogens. Three parameters were controlled: drying substrate, atmospheric relative humidity (RH), and final a_W. To observe the effects of drying on bacterial cells, cultivability after treatment was measured and the growth delay and cell recovery capacity were estimated. This provided an indirect measure of the deleterious effects on and repairable damage to the bacteria.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Bacteria species

Salmonella enterica subspecies *enteric*a serovar Typhimurium DT104 DSM 10506 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T species were used. All cultures were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at –80 °C. For resuscitation, bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 24 h and were placed for a maximum of one month at 4 °C. Five colonies of each bacterium were collected in 50 mL of TSB and incubated for 8 h at 37 °C. Suspensions were then diluted in 50 mL of new TSB to reach an optical density (OD) of 0.01 at 600 nm. Cultures in stationary growth phase were obtained after 14 h at 37 °C.

2.4.2. Drying conditions

2.4.2.1. Drying atmosphere

Hermetic boxes were used to dry the cellular suspensions. Saturated salt solutions were placed at the bottom to regulate the a_W and the atmospheric RH. Lithium chloride, potassium acetate, potassium carbonate, and sodium bromide (all from Sigma-Aldrich) were used in sufficient quantity to observed salt crystals in 100 mL of distilled water, corresponding to a height of 2 cm in the bottom of the hermetic boxes. Their respective a_W values were 0.11, 0.25, 0.44, and 0.58, which corresponded to RH values of 11%, 25%, 44%, and 58%, respectively (275). The atmosphere was maintained under convection using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) as described in previous work (276). All experiments were performed at room temperature (near 25°C).

2.4.2.2. Drying kinetics of PBS and milk by following the weight loss

The drying of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) and whole milk from milk powder that was rehydrated by following the manufacturer instructions (10% w/v, 26% fat, Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) was monitored by measuring the weight loss over time. The weight was measured with a precision balance (±0.0003 g) (Sartorius, Aubagne, France). The measured weight loss followed the first-order law (**Equation 12**). Using the reduction in the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), we estimated three variables: a, K, and τ. These provided a characterization of the drying rate.

$$w_t = a + Kexp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (12)$$

where w_t (g) represents the weight at time t (s), a represents the dried weight (g), K represents the initial water weight (g), and τ is the time constant (s). The initial drying rates were calculated as a derivation of w_t at $t = 0$ s.

Because only water evaporated, this loss of weight was translated into water content (grams of water per gram of dried material), and its relationship with the sorption curve of PBS or milk was used to evaluate the a_W evolution of the sample during drying. The PBS sorption curve was obtained by measuring the water content corresponding to several a_W values. The milk desorption curve was based on an equation given in a previous work (277), which allowed us to calculate the water content corresponding to each a_W value.

2.4.2.3. Preparation of the initial cellular suspension

Cell concentration was adjusted to 10^8 colony-forming units (CFU)/mL by measuring OD_{600} and according to calibration curves showing the link between OD_{600} and cell concentration in CFU/mL. Twenty-five-milliliter cultures were centrifuged (3400 × *g*, 10 min at 25 °C) and washed twice with an equal volume of PBS. The supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in 25 mL of PBS. The final bacterial number was recorded as the number of CFU by plate counting on TSA (24h, 37°C).

2.4.2.4. Drying in PBS

Droplets (10 µL containing around 10^6 bacterial cells) of bacterial suspension were spread in a small glass dish to obtain an estimated 14 µm height layer, and the dish was placed inside a box for a given time (4.5, 15, 45, 90, 180, or 840 min). After drying, the cells were rehydrated by the addition of 990 µL of PBS and homogenized by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les

Ulis, France) permitting to suspend the initial dropped bacteria (containing around 10^6 living and dead bacterial cells).

2.4.2.5. Drying in milk

The cell suspension was concentrated by centrifugation to obtain a concentration of 10^9 CFU/mL. This concentrated suspension was diluted in milk to obtain a concentration of 10^8 CFU/mL. The same protocol was applied to 10 µL of contaminated milk as described above (**section 2.4.2.4.**).

2.4.3. Drying effects on bacterial cells

2.4.3.1. Effects of drying on the loss of cultivability

After drying under different conditions and on different substrates, cells were recovered and CFU were determined by plate counting on TSA medium after 24 h at 37 °C. The result was compared with the initial bacterial concentration and expressed as $\log(N/N_0)$, where N represents the CFU of stressed bacteria and N_0 represents the CFU of the initial bacterial suspension.

2.4.3.2. Effects on growth recovery capacity

2.4.3.2.1. Growth curves of dehydrated–rehydrated bacteria

The bacterial growth kinetics before and after the drying process were assessed and compared for *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*. A 0.5 mL aliquot of the bacterial suspension at a concentration of 10^2 CFU/mL of cultivable cells was transferred to 9.5 mL of TBS and incubated at 37 °C. The OD_{600} was measured every hour for 20 h.

2.4.3.2.2. Calculation of the delay in growth recovery

To determine the growth delay induced strictly by the drying process, an adjustment of the measured points of bacterial growth to a sigmoid curve was performed (264) (**Equation 13**). Using the reduction in the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), three representative variables of the growth kinetics were calculated: OD_{max}, b, and r.

$$OD_t = \frac{OD_{max}}{(1 + bexp(-rt))} \quad (13)$$

where OD_t represents the OD at time t (h), OD_{max} represents the OD of the stationary growth phase, and b and r (h^{-1}) are constants.

μ_{max} and the inflexion point (t_{Inflex}) were then calculated as shown in **Equation 14** and **15**, respectively.

$$\mu_{max} = \max(OD'_t) \quad (14)$$

$$t_{Inflex} = \frac{\ln(|a|)}{r} \quad (15)$$

where μ_{max} (h^{-1}) represents the maximum growth rate, and t_{Inflex} (h) represents the inflexion time of the growth curves.

The time to detect bacterial population was estimated as the time corresponding to the intersection between the tangent to the inflexion point, which had μ_{max} as the slope, and the abscissa axis.

Finally, to compare the previously calculated time to detect bacterial population for each bacterial species and each treatment, the time delay of growth recovery was normalized as shown in **Equation 16**:

$$t_{delay} = t_{d(D)} - t_{d(C)} \quad (16)$$

where t_{delay} (h) is the resulting calculated time delay of growth recovery, $t_{d(D)}$ (h) is the time to detect bacterial population calculated from the growth curve for dried bacteria, and $t_{d(C)}$ (h) is the time to detect bacterial population calculated from the growth curve for fresh culture. Because we designed this experiment for cultivable cells, we used this method to estimate the repairable damage.

2.4.4. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. To compare the results obtained in this study, the variance homogeneity (F-test) was tested and then, if $P > 0.05$, an ANOVA or t test was applied using R software (278). In the case of significant ANOVA, a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions.

2.5. Results

Our study focused on the effects of drying on *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability and growth recovery capacity. Our results are presented in three parts: loss of bacterial cultivability as a function of drying time, loss of bacterial cultivability as a function of a_W evolution, and delay in bacterial growth recovery as a function of the initial drying rate and final a_W.

2.5.1. Evolution of the loss of *S*. Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time

2.5.1.1. Drying in PBS

The loss of *S*. Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during drying was assessed at different atmospheric RHs (11%, 25%, 44%, and 58% RH) and over time (4.5, 15, 45, 90, 180, and 840 min) in PBS. A significant difference was observed in the loss of bacterial cultivability, with significant effects of time and species (ANOVA, $P < 0.05$). The loss of cultivability always decreased during drying (**Figure 28**). This decrease was nonlinear for both species for all conditions, and two phases were observed.

The first phase of loss of cultivability decrease was sharp, as observed between 0 and 45 min at all atmospheric RHs for *S*. Typhimurium and *C. sakazakii*. For *S*. Typhimurium, this decrease represented –3.2 log at 11%, –3.0 log at 25%, –3.3 log at 44%, and –2.7 log at 58% RH. For *C. sakazakii*, this decreased represented –1.6 log at 11%, –2.2 log at 25%, –2.3 log at 44%, and –1.9 log at 58% RH.

The second phase corresponded to a slow decrease and stabilization of the loss of cultivability (**Figure 28**), and occurred between 45 min and the end of the treatment. For *S*. Typhimurium, stabilization was observed near –3.9 log at 11%, –4.0 log at 25%, –4.0 log at 44%, and –4.0 log at 58% RH. For *C. sakazakii*, stabilization was observed near –2.7 log at 11%, –3.0 log at 25%, –3.0 log at 44%, and –2.6 log at 58% RH. In general, *C. sakazakii* was less sensitive to drying than *S*. Typhimurium, and the difference was 1.0 log for all drying conditions.

These results indicate that the decrease in the loss of cultivability during drying versus time was substantial and nonlinear.

2.5.1.2. Drying in milk

The loss of *S*. Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during milk drying was assessed in the same conditions as in the experiments using PBS. A significant difference was observed in bacteria cultivability, with a significant effect of time (ANOVA, $P < 0.05$). No effect of species was detected, and this decrease was nonlinear for both species in all conditions. As in the drying in PBS, two phases were observed (**Figure 28**).

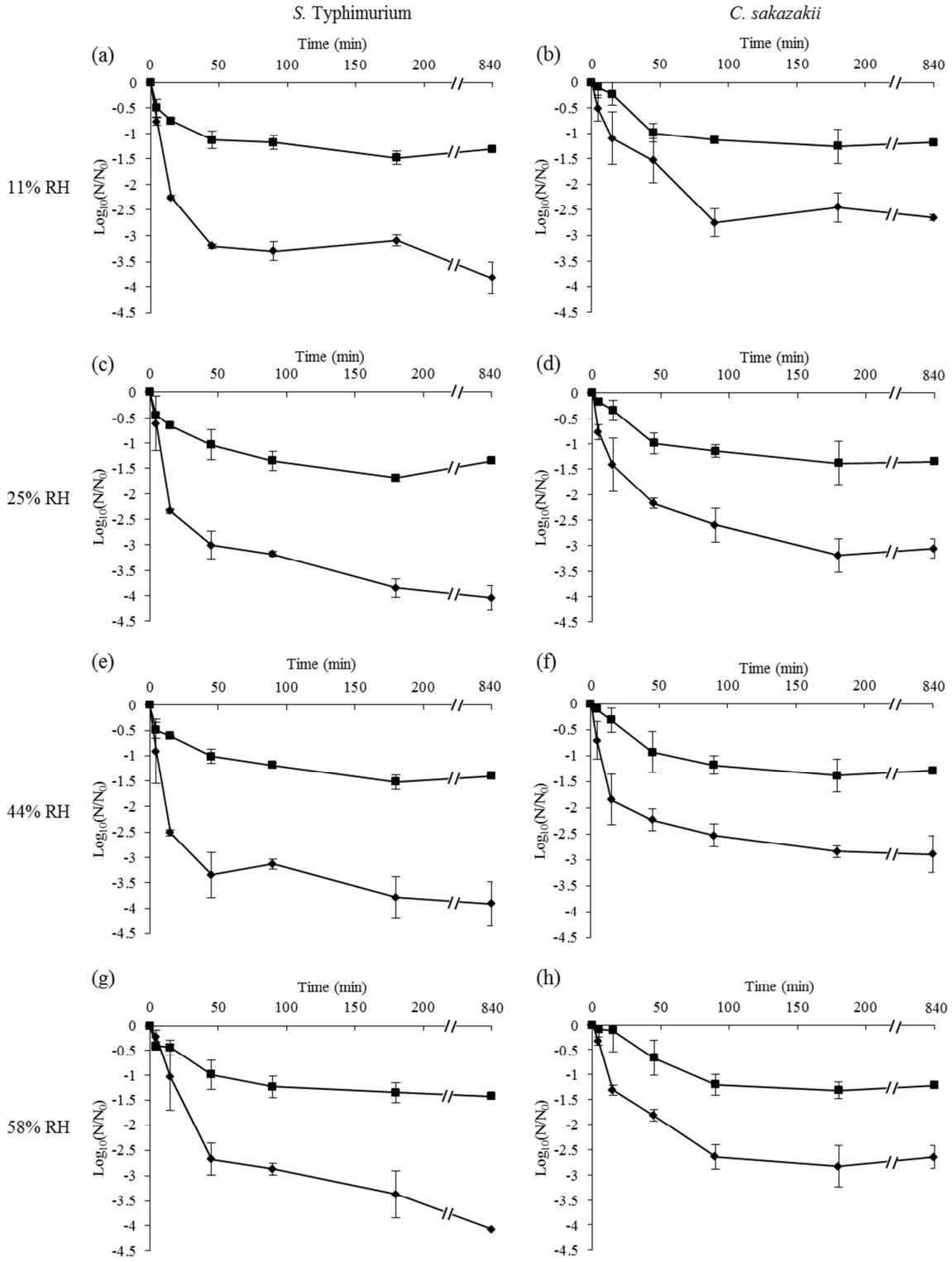

Figure 28 : Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time in four atmospheres. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL, and the method detection limit was about –4.5 log. Squares and diamonds represent the results in milk and PBS, respectively. (a) *S.* Typhimurium dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S.* Typhimurium dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S.* Typhimurium dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S.* Typhimurium dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% relative humidity. Error bars represent standard deviations obtained from triplicates.

The first phase of cultivability decrease was sharp and was observed between 0 and 45 min at all atmospheric RHs for both bacterial species. For *S.* Typhimurium, this decrease represented –1.0 log at all RHs, excepted at 11% RH where decrease represented –1.1 log. For *C. sakazakii*, the loss of cultivability represented –1.0 log at 11% and 25%, –0.9 log at 44%, and –0.7 log at 58% RH. The second phase was a slow decrease and stabilization of cultivability, which occurred between 45 min and the end of drying. For *S.* Typhimurium, stabilization near –1.3 log at all RHs was observed. For *C. sakazakii*, stabilization occurred near –1.2 log at 11%, –1.4 log at 25%, –1.4 log at 44% and –1.3 log at 58% RH. The two phases of the loss of *C. sakazakii* and *S.* Typhimurium cultivability exhibited the same behavior as observed for drying.

We compared the effects of milk and PBS (**Figure 28**) to examine the effect of the substrate on drying efficiency. ANOVA showed a highly significant ($P < 0.001$) effect of the drying substrate on cultivability for both species. Cultivability of both species was always higher in milk than in PBS. For both media, the loss of cultivability was nonlinear. Contrary to PBS, treatment in milk did not exhibit a species effect during drying.

2.5.2. Evolution of the loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as function of the a_W evolution

The nonlinearity observed for all drying conditions presented in Fig. 1 showed that time could not explain the decrease in cultivability for both species and for both substrates. To relate the loss of pathogen cultivability to the a_W evolution during drying, the drying kinetics were examined under the different conditions by following the loss of water weight at 58%, 44%, 25%, and 11% RH over time. The time constants of water loss systems τ and the initial drying rates were calculated as a first-order system for each condition to provide information about the drying kinetics (**Tableau 10**).

Water content was determined from the weight loss at each time of measurement. Using the milk and PBS sorption curves (**Figure 29**) reported from previous work (277) and established in this study, respectively, we expressed the loss of cultivability as a function of the a_W evolution during drying (**Figure 30**).

2.5.2.1. Evolution of the loss of PBS and milk weights during drying

In the classical modeling of the weight loss during drying as a first-order system (**Equation 12**), the weight loss for time τ (min) (**Tableau 1**) and time 5τ (min) represents 63% and 99% of the total weight loss, respectively. ANOVA showed that these τ values differed significantly ($P < 0.05$) as function of the atmospheric RH and the drying substrate. Using this model, in the PBS condition, 28.1, 25.2, 21.1, and 15.1 min were required to lose 99% (corresponding to 5τ) of the maximum weight loss at 58%, 44%, 25%, and 11% RH, respectively. In this analysis, 58% RH

provided the slowest rate and 11% RH the fastest rate. Similarly, 25.8, 23.3, 18.3, and 9.0 min were required to lose 99% of the maximum loss of milk weight at 58%, 44%, 25%, and 11% RH, respectively. Similar observations were made for the initial rate of drying (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Calculated time constants for weight loss τ and the initial drying rates for the loss of water weight ($mg.min^{-1}$) for each drying condition for PBS and milk substrates.

Atmospheric RH	PBS		Milk	
	τ (min)	Initial rate ($mg.min^{-1}$)	τ (min)	Initial rate ($mg.min^{-1}$)
11%	3.0 (±0.08)^{ab}	−3.00 (±0.12)^{ab}	1.8 (±0.27)^{b}	−5.46 (±1.32)^{b}
25%	4.2 (±0.69)^{ab}	−2.82 (±1.02)^{ab}	3.7 (±0.94)^{ab}	−3.06 (±1.20)^{ab}
44%	5.0 (±0.15)^{ab}	−2.58 (±0.30)^{a}	4.7 (±0.95)^{ab}	−2.04 (±0.54)^{a}
58%	5.6 (±0.17)^{a}	−1.80 (±0.06)^{a}	5.2 (±0.95)^{a}	−1.98 (±0.72)^{a}

Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates.
The letters represent a significant difference ($p<0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test, independently for τ and for initial rates

As τ and the initial drying rates decreased with the increasing drying atmospheric RH, the loss of cultivability could be expressed as function of the a_W evolution of the substrate.

2.5.2.2. Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as function of the corresponding substrate a_W level

As previously described, milk and PBS desorption curves (**Figure 29**) and a_W evolution differed substantially. For instance, to reduce from an a_W of 0.99 to 0.80, the water content decreased from 99% to 78%.

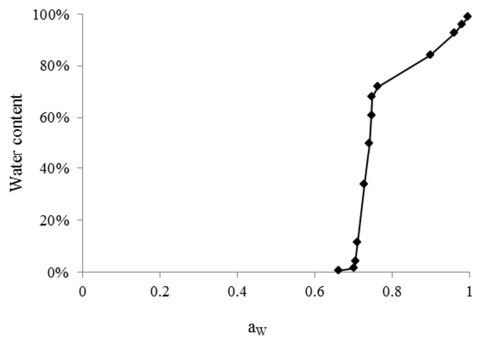

Figure 29 : Sorption curves of PBS at 20 °C expressed with water content as function of aw.

In milk, for the same a_W change, the water content decreased from 99% to 20%. Consequently, we have expressed the loss of cultivability as a function of a_W, as shown in Fig. 3.

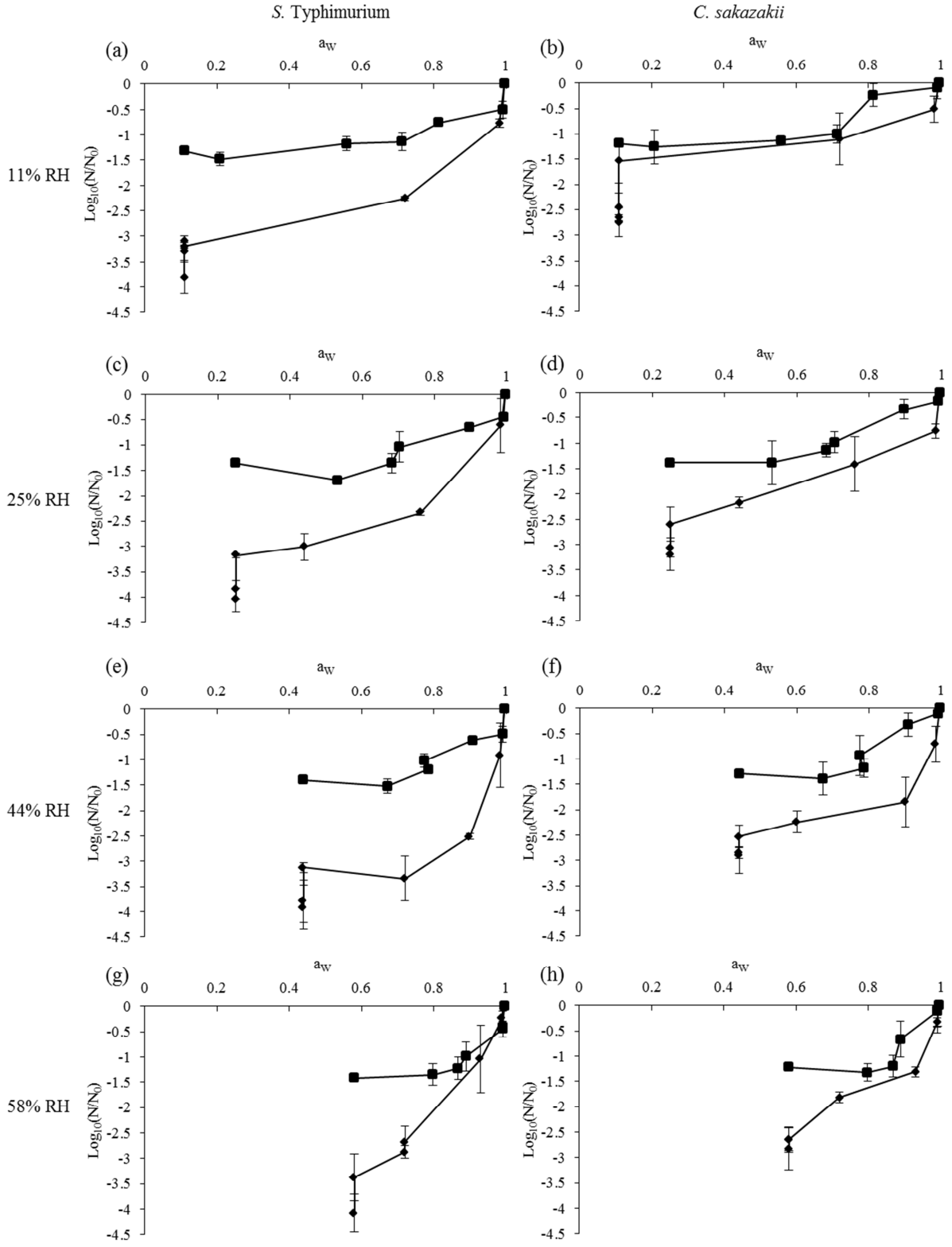

Figure 30 : Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during drying in air equilibrated at four relative humidity (RH) levels as a function of the calculated suspension aw. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL and the method detection limit was about −4.5 log. Squares: drying in milk; diamonds: drying in PBS. (a) *S.* Typhimurium dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S.* Typhimurium dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S.* Typhimurium dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S.* Typhimurium dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% RH. Error bars represent SDs obtained from triplicates.

For drying in PBS, three phases were observed for all conditions and in both species. The first phase of the decrease in cultivability was observed between an a_W of 0.99 and 0.90 at all atmospheric RHs for both species. When comparing the different RH atmospheres of drying for *S.* Typhimurium, the loss of cultivability for drying at 0.90 a_W was estimated as –1.4 log at 11%, 24%, and 58% RH and at –2. 5 log at 44% RH. For *C. sakazakii*, at the same drying level, the values were estimated as –0.8 log, –1.2 log, –2.0 log, and –1. 5 at 11%, 25%, 44%, and 58% RH, respectively. These results suggest that the initial drying rate was substantial and that the rate corresponding to 44% RH was the more deleterious for the cultivability of both species. The second phase was a slow linear decrease, which represented a smaller loss of cultivability. We found that the change in cultivability as a function of a_W was more linear than as a function of time in PBS for the smallest a_W (0.11 and 0.25). For drying in milk, the same assessment can be done for both bacteria. When expressing the loss of cultivability as a function of a_W, at the end of drying, the loss of cultivability remained greater in milk than in PBS. The third phase corresponded to a stationary phase in which a_W was constant (last point in Fig. 3).

2.5.3. Effects of drying on growth recovery capacity of cultivable cells

Growth curves of both species before and after different drying levels in milk and in PBS were obtained by following the OD_{600}, after rehydration and inoculation in TSB. This allowed us to evaluate the effects of different drying conditions on bacterial cells by comparing the times to detect bacterial population for dehydrated–rehydrated bacterial cells. The supplementary time to detect bacterial population, as an estimate of growth recovery capacity, was estimated for all atmospheric RHs of drying. We evaluated the effects of the initial drying rate to reach an a_W of 0.90 (**Tableau 11**) and of the final a_W (**Tableau 12**) on the delay in growth recovery at the same cultivable bacterial concentration. This provided an estimation of the reversible injury caused by drying. It should be noted that we reported results obtained in all conditions to the control and then compared among them. Statistical analyses were performed to determine whether the tested conditions differed significantly from the control.

2.5.3.1. Effects of the initial drying kinetics

For all drying conditions corresponding to 11%, 25%, 44%, and 58% RH, the supplementary times to detect bacterial population after drying until an a_W of 0.90 are shown in Table 2. In the first part of drying, the decreases in cultivability were severe for each species (**Figure 30**). These results allowed us to compare the effects of the initial drying rate on the capacity of the bacteria to repair the injuries and to regrow.

Tableau 11 : Comparison of supplementary time to detect bacterial population of species desiccated in PBS and milk submitted to different initial drying rates to reach an a_W of 0.90[1]

Species	Substrate	Supplementary time to detect bacterial population obtained after drying at different initial drying rates to reach an a_W of 0.90			
		Rate 1[2]	Rate 2[3]	Rate 3[4]	Rate 4[5]
S. Typhimurium	PBS	+1.6 h (±0.6)^{ab}	+0.9 h (±0.4)^{bc}	+0.1 h (±0.5)^{c}	+0.2 h (±0.2)^{c}
	Milk	+0.3 h (±0.1)^{c}	+0.2 h (±0.1)^{c}	+0.4 h (±0.3)^{c}	+0.2 h (±0.4)^{c}
C. sakazakii	PBS	+3.0 h (±0.5)^{a}	+1.5 h (±0.4)^{abc}	+1.2 h (±0.7)^{bc}	+0.3 h (±0.4)^{c}
	Milk	+0.2 h (±0.5)^{c}	+0.1 h (±0.1)^{c}	+0.2 h (±0.3)^{c}	+0.1 h (±0.6)^{c}

Rehydration was performed in PBS and, after, cells were inoculated in TSB and incubated at 37 °C. The supplementary time to detect bacterial population is an expression of the difference between desiccated bacteria and undesiccated bacteria. Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p<0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test.
1. Obtained with different atmospheres
2. Initial drying rate corresponding to drying at 11% RH
3. Initial drying rate corresponding to drying at 25% RH
4. Initial drying rate corresponding to drying at 44% RH
5. Initial drying rate corresponding to drying at 58% RH

The initial drying rates for each condition were previously calculated in milligrams of water per minute, and are expressed in a_W units per minute through the translation of water weight in a_W using the sorption curves (**Tableau 10**). To extend this analysis to drying in PBS and milk, the initial drying rate at 11% RH was called rate 1 and corresponded to -29.9×10^{-4} and -7.30×10^{-4} a_W units per minute for PBS and milk, respectively. Similarly, 25% RH was called rate 2 and corresponded to -26.1×10^{-4} and -7.28×10^{-4} a_W units per minute, 44% RH was called rate 3 and corresponded to -25.2×10^{-4} and -7.27×10^{-4} a_W units per minute, and 58% RH was called rate 4 and corresponded to -11.2×10^{-4} and -7.26×10^{-4} a_W units per minute, respectively. The initial drying rate was substantially influenced by the drying substrate, and the drying kinetics of PBS was faster than the drying kinetics of milk.

In the control, no supplementary times to detect bacterial population were observed in milk, but some differences were observed in PBS. For *S.* Typhimurium, significant differences (*t* test, $P < 0.05$) from the control were observed for the initial rates 1 (11% RH) and 2 (25% RH) and corresponded to +1.6 h and +0.9 h of supplementary time to detect bacterial population. As shown in **Figure 30**, to reach an a_W of 0.90, the most damaging condition was initial rate 3 (44% RH). For *C. sakazakii*, initial rates 1, 2, and 3 showed significant differences (*t* test, $P < 0.05$) in growth recovery capacity from the control: +3.0 h, +1.5 h, and +1.2 h of delay.

2.5.3.2. Effects of the final drying level

The supplementary times to detect bacterial population after drying at the final a_W values of 0.11, 0.25, 0.44, and 0.58 are shown in Table 12 (**Tableau 12**). The final a_W represents the equilibrium a_W for each drying condition. These results permitted us to compare the effects of the final a_W of drying on the capacity of bacteria to repair damage.

Tableau 12 : Comparison of supplementary time to detect bacterial population for bacteria desiccated in PBS and milk submitted to drying to reach different final a_W levels.

		Supplementary time to detect bacterial population after drying at different final a_W			
Species	Substrate	0.11[1]	0.25[2]	0.44[3]	0.58[4]
S. Typhimurium	PBS	+1.1 h (±0.9)^{ab}	+1.7 h (±0.7)^{ab}	+1.4 h (±1.1)^{ab}	+0.6 h (±0.9)^{b}
	Milk	+0.2 h (±0.3)^{b}	+0.1 h (±0.1)^{b}	+0.9 h (±0.1)^{b}	+0.3 h (±0.3)^{b}
C. sakazakii	PBS	+2.7 h (±0.5)^{ab}	+2.6 h (±0.8)^{ab}	+2.9 h (±1.1)^{a}	+1.1 h (±0.4)^{ab}
	Milk	+0.2 h (±0.1)^{b}	+0.3 h (±0.1)^{b}	+0.1 h (±0.2)^{b}	+0.1 h (±0.5)^{b}

Rehydration was performed in PBS and, after, cells were inoculated in TSB and incubated at 37 °C. The supplementary time to detect bacterial population is an expression of the difference between desiccated bacteria and undesiccated bacteria. Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p<0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test.
1. Represents the final a_W obtained through drying at 11% RH
2. Represents the final a_W obtained through drying at 25% RH
3. Represents the final a_W obtained through drying at 44% RH
4. Represents the final a_W obtained through drying at 58% RH

Regarding all drying final a_W values, supplementary times to detect bacterial population were observed in PBS but not in milk. Comparison of these supplementary delays (**Tableau 12**) in growth recovery with the supplementary delays in growth recovery obtained after drying to an a_W of 0.90 for both species (**Tableau 11**) showed no differences at 11% RH but differences for other atmospheric RHs. The increases in pathogen delay recovery were greater during the first step of drying, which reached an a_W of 0.90, than during the following step to reach the final a_W. For example, for *C. sakazakii*, the increase in delay was about +1.2 h for the first 0.10 a_W decrease (to reach 0.90) and about +1.7 h for the last 0.46 a_W decrease (to reach 0.44). Consequently, the increase in delay of growth recovery was not proportional to the decrease in a_W.

Also, milk and PBS had different effects on the supplementary time to detect bacterial population.

2.6. Discussion

In this study, we used several approaches to evaluate the effects of drying conditions on *S.* Typhimurium and *C. sakazakii*. Cultivability was used as an estimate of viability and deleterious damage, and growth recovery capacity was used to evaluate the injury to cultivable cells. The main reason for this approach was to determine whether the substrate a_W could explain the loss of pathogen cultivability as a function of the a_W evolution during drying. **Table 13** (**Tableau 13**) summarizes the effects of drying on both species.

For the two substrates tested, the first cultivability decrease and delay in recovery were compared. Upon reaching an a_W of 0.90 in PBS, the cultivability of *S.* Typhimurium decreased suddenly and reversible damage occurred at the lowest RH conditions (25% and 11% RH) of drying (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Effects of drying on the loss of cultivability and delay in growth recovery for both species in two substrates.

		Loss of cultivability								Delay of growth recovery							
		Initial drying rate[a]				From 0.90 to final drying level[b]				Initial drying rate[a]				From 0.90 to final drying level[b]			
Species	Substrate	Rate 1	Rate 2	Rate 3	Rate 4	0.11[c]	0.25[d]	0.44[e]	0.58[f]	Rate 1	Rate 2	Rate 3	Rate 4	0.11[c]	0.25[d]	0.44[e]	0.58[f]
S. Typhimurium	PBS	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	++	+	–	–	–	+	+	–
	Milk	+	+	+	++	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
C. sakazakii	PBS	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	+++	++	+	–	–	+	++	+
	Milk	+	+	+	++	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–

– and + refer to the effects of drying on the loss of cultivability and the delay in growth recovery related to the two phases of drying in different conditions

a. To reach an a_W of 0.90 in the different atmospheric RHs, see Table 2

b. From 0.90 to the final drying level (0.11, 0.25, 0.44, and 0.58) in different atmospheric RH

c. Represented the final a_W obtained through drying at 11% RH

This shows the initial drying kinetics. At the beginning of drying (until an a_W of 0.90), evaporation of water causes an increase in osmotic pressure and solute concentration in the extracellular medium and a large cellular water outflow from the cells; the kinetics of these processes affects the cells (100). For both substrates, the desiccation stress provokes an osmotic stress due to the loss of intracellular water increasing solute or ion concentrations in the cell. In PBS, this osmotic stress is due to an increase in salt concentration. Even if the bacteria could adapt, damage caused by this stress affects macromolecules and membranes (100, 276, 279). These modifications can be irreversible and may decrease cultivability. However, they can also be reversible but require repair mechanisms before the cells can develop and grow, which would explain the supplementary time to detect bacterial population observed in this study caused by the presence of injured cells (280, 281). In terms of the cultivability of *S.* Typhimurium, the effects of the kinetics were more deleterious at 44% and 58% than at 25% and 11% RH (**Tableau 10**), and the supplementary delay of growth recovery occurred earlier for the faster kinetics (at 11% and 25% RH) than for the slower kinetics (at 44% and 58% RH) in PBS (**Tableau 13**). Nevertheless, if growth recovery delay does not increase as the cultivability decreases, the damage occurring during drying can be deleterious or irreversible. Damage induced by exposure to air at 44% and 58% RH was irreversible; in contrast, at 25% and 11% RH the damage was reversible (**Tableau 13**). *C. sakazakii* is known to be more resistant than *S.* Typhimurium (27, 282), which we also found in our study of cultivability in PBS (**Tableau 13**).

Taken together, the available information suggests that, depending on the substrate, the choice of the initial drying rate is crucial for inducing a maximum first cultivability decrease and causing irreversible damage to pathogenic cells.

For all drying conditions, loss of cultivability became slower after 45min or after reaching an a_W of 0.90 in PBS. After the first loss of water and around an a_W of 0.90, cells began to be exposed to the atmosphere. The water removal in extracellular and intracellular media generates reactive oxygen species in cells and the accumulation of free radicals (19, 100), which can promote structural protein modifications, damage to cellular molecule aggregations, and membrane lipid bilayer disruption (99, 276, 283, 284). For *S.* Typhimurium, the growth recovery capacity was

affected at a final a_W of 0.11, 0.25, and 0.44 but not at 0.58 (**Tableau 13**). This suggests that the oxidation during drying depends on the a_W range. This has been shown for lipid oxidation, which depends on the a_W and is maximal at 0.60, decreases to 0.40, and increases again to 0.10 at a lower level than at 0.60 (285).

In both drying levels at 11% RH in PBS, to reach a_W levels of 0.90 and 0.11 (**Tableau 13**), no differences were observed between species for the delay in growth recovery, but differences were observed for cultivability. Subsequently, modifications caused by the slow phase of drying may have generated such irreversible damage. In an extreme drying such as drying to an a_W of 0.11, the water removal can affect protein structure irreversibly, as shown by Leslie et al. (150) who found a correlation between the loss of cultivability and protein denaturation during drying. Protein denaturation can also affect the integrity of the plasma membrane, which comprises proteins and lipids (276). In the same way, with the decrease from an a_W of 0.90 to 0.44, injury occurred at 44% RH for *S.* Typhimurium, and this was accompanied by a very slow decrease in cultivability.

Our findings indicate that the final a_W after drying is an important parameter in determining the extent of irreversible damage and, at the same, the kinetics used to cross an oxidative a_W range can promote the loss of bacterial cultivability *in situ*.

In addition, as shown at final water activity for all drying in PBS, a decrease in cultivability occurred during maintaining at 0.11, 0.25, 0.44 or 0.58. This information is in accordance with the literature; the storage at low water activity is known to be deleterious for bacterial cells (25, 286).

In our study, the cultivabilities of both bacteria were preserved during drying in milk compared with drying in PBS, which shows a strong protective effect of milk (**Figure 29**). This may be explained by the difference between the PBS and milk desorption curves. The PBS desorption curve has a sigmoid form with a large decrease in a_W for a small loss of water content until an a_W of 0.72, which is the saturation a_W of PBS. Unlike PBS, the milk desorption curve presents as a tangential form with a slow decrease in a_W for a large loss of water content until an a_W of 0.80 (**Figure 29**). Milk is used for bacterial protection in freeze-drying and spray-drying processes because of its glassy properties and its composition (109, 287). Disaccharides at high concentrations are protective against drying and freeze-drying, and lactose has a protective effect on cultivability in lactic acid bacteria (288). Milk also comprises proteins and phospholipids, and these two components may provide supplementary targets for oxidation, which might reduce the extracellular oxidative effects on these cells. These properties of milk may explain the preservation of both bacteria species during drying (288). Additionally, loss of cultivability was less important in milk than in PBS, and the surviving cells did not display any

reversible damage when dried in milk and displayed only minor reversible damage when dried in PBS (**Tableau 13**). This suggests the existence of different subpopulations with different sensitivities to drying (159, 280, 289).

Considering that milk erased the bacterial species effect, we suggest that the drying substrate, and more precisely the pathogen–substrate pairing, is a major parameter implicated in the loss of bacterial cultivability during drying.

2.7. Conclusion

Different drying parameters (kinetics, atmospheric RH, bacterial species, and food substrates) affected the loss of bacteria cultivability. The growth recovery capacity was critically influenced by the first step of drying, which represented the first loss of water to an a_W of about 0.90 and involved osmotic stress. As the drying rate increased, the loss of cultivability and the extent of repairable damage decreased. Bacterial cultivability and growth recovery were also influenced by the second phase of drying but to a lesser extent, which could be related to an oxidative stress mainly due to the prolonged contact between air and cells. Our results indicate that the drying conditions are important for cell resistance and can be controlled to maximize the death of pathogens. The a_W seems provide information for the monitoring and control of pathogenic microorganisms during drying. If used appropriately, drying may provide a complementary tool to ensure food safety. However, further research is needed before developing applications. The effects of drying parameters on bacterial viability should be studied in other pathogens, for different food substrates, and in association with various decontamination processes. Further testing in industrial conditions is also needed.

2.8. Acknowledgement

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (France) and Novolyze (France), which are gratefully acknowledged.

3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons observé l'impact de différents paramètres de séchage (cinétique, humidité relative de l'atmosphère et substrat de séchage) sur la perte de cultivabilité et la reprise de croissance de *Salmonella enterica* sérotypes Typhimurium et Senftenberg ainsi que *Cronobacter sakazakii.* La première étape de séchage, correspondant à la principale perte d'eau cellulaire en milieu liquide, entraine à un stress osmotique délétère pour les cellules. La deuxième phase de séchage, correspondant au passage en milieu aérien, influence dans une moindre mesure la cultivabilité bactérienne des deux espèces, ce qui est certainement dû à un stress oxydatif induit par le contact prolongé des cellules avec l'air. Le substrat de séchage ou le produit alimentaire à sécher est de première importance. Les résultats montrent clairement que le lait possède un effet protecteur sur la cultivabilité bactérienne évaluée après séchage. C'est notamment pour cette raison que le lait a été choisi pour la suite de l'étude comme support de l'inoculation bactérienne en vue d'observer la résistance thermique des bactéries. De plus, si les conditions de séchage sont bien maitrisées, il est possible de conserver un maximum ou un minimum de cultivabilité. Par exemple, pour optimiser l'inactivation des pathogènes, une cinétique initiale intermédiaire (parmi celles testées) et un niveau faible d'activité de l'eau (0,25 ou 0,11) peuvent être appliqués. Cependant, avant de poursuivre sur le traitement thermique de bactéries sèches, nous nous sommes demandés quelles étaient les parts d'inactivation liées au séchage et à la réhydratation qui est aussi une étape indissociable du séchage (Chapitre 2).

Chapitre 2

Impact des Conditions de Réhydratation sur l'Inactivation de Microorganismes Pathogènes Déshydratés

1. Introduction

L'évaluation de l'inactivation bactérienne dans les produits secs implique une étape de réhydratation qui est nécessaire pour restaurer l'activité cellulaire. L'influence de cette étape a déjà été étudiée en milieu liquide dans le cas de bactéries d'intérêt technologique (149, 290).

Néanmoins, l'influence de la cinétique de réhydratation n'a pas été étudiée chez les pathogènes alimentaires, en particulier dans le cas des produits secs. La méthode actuelle pour l'évaluation de la sécurité microbienne des produits alimentaires secs est basée sur une réhydratation rapide dans un tampon liquide (PBS, eau peptonée, trypton sel,…). Cependant, le mode de réhydratation, et en particulier la cinétique de réhydratation, peut considérablement influer sur la mesure de cultivabilité et peut conduire à une estimation erronée du nombre de bactéries pathogènes et donc à un danger pour le consommateur qui dans certains cas peut réhydrater lentement ces aliments secs. Dans ce chapitre, nous avons cherché à distinguer les effets de séchage seul (ou de la déshydratation) des effets de la réhydratation, qui sont deux étapes liées.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- Observer l'impact les conditions de réhydratation sur la cultivabilité des bactéries pathogènes étudiées
- Evaluer la part relative du séchage seul et de la réhydratation sur l'inactivation des bactéries pathogènes

Cette partie a fait l'objet d'une publication parue dans le journal *PLoS ONE* : LANG, E., ZOZ, F., IACONELLI, C., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P. (2016). **Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics.** DOI: 10.1371/journal.pone.0160844

2. Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics

LANG, E., ZOZ, F., IACONELLI, C., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P.

2.1. Abstract

Drying is a common process which is used to preserve food products and technological microorganisms, but which is deleterious for the cells. The aim of this study is to differentiate the effects of drying alone from the effects of the successive and necessary rehydration. Rehydration of dried bacteria is a critical step already studied in starter culture but not for different kinetics and not for pathogens. In the present study, the influence of rehydration kinetics was investigated for three foodborne pathogens involved in neonatal diseases caused by the consumption of rehydrated milk powder: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii*. Bacteria were dried in controlled relative humidity atmospheres and then rehydrated using different methods. Our results showed that the survival of the three pathogens was strongly related to rehydration kinetics. Consequently, rehydration is an important step to consider during food safety assessment or during studies of dried foodborne pathogens. Also, it has to be considered with more attention in consumers' homes during the preparation of food, like powdered infant formula, to avoid pathogens recovery.

2.2. Introduction

Drying is an environmental and technological perturbation involving a water transfer from a liquid state to a gaseous state, following the a_W gradient which allows the transformation from a liquid to a solid and dried product. Water activity or a_W represents the available water for chemical and biochemical reactions and is theoretically comprised between 0 (no water) and 1 (pure water). During drying, the water activity of products is reduced, preventing bacterial growth and below an a_W of 0.6, no microorganisms can grow. This is the reason why drying is a common method used for the preservation of food products or microorganisms of technological interest such as lactic acid and probiotic bacteria. Several methods can be used to reduce a_W and, consequently, to dry food or microorganisms. Common drying processes are spray-drying, fluidized bed drying and freeze-drying (109, 291) and are used to conserve dried food products such as herbs, spices or milk. Moreover, drying has a deleterious effect on cells. Indeed, at the beginning of the drying process, evaporation of water causes an increase in the osmotic pressure of the extracellular medium and, consequently, provokes a large cellular water outflow from the

cells creating then an osmotic stress which is damaging for cells (100). Afterward, in the case of drying conducing to products of low a_W, the water removal from extracellular and intracellular media will provoke a direct exposition of cells to oxygen in the air which generates reactive oxygen species in cells and the accumulation of free radicals, creating oxidative stress (19, 100). Damages caused by this stress affect macromolecules and membranes (99–101, 276, 279, 284). Nevertheless, even if drying involves cellular injuries to bacterial cells, dried foods are non-sterilized foods (8) and a large range of microorganisms can survive drying such as fungi, like *Aspergillus* spores, bacteria, like *Salmonella* spp., and viruses, like Norovirus (8, 43). Some of them can be dangerous for consumers' health and this is the reason why a great deal of research is focused on the development of specific decontamination processes (272) for the purpose of achieving a minimal microbial load in dried food according to legal requirements and for consumer health protection.

Assessment of microbial survival in dried products involves a rehydration step that is necessary in the method to restore cellular activities, permitting to reach a physiological a_W. The influence of this step has already been studied for the optimization of preservation processes of lactic acid bacteria and flora with technological purpose in a dried form (109). For example, Morgan *et al.* (2006) reviewed the impact of rehydration of freeze dried lactic acid bacteria and presented it as the final critical step for the revival of cells after drying. Nevertheless, the rehydration kinetics has not been investigated in foodborne pathogens. Moreover, this step has been neglected in the case of pathogens contaminating dried foods or environments. Accordingly, the current method for microbial safety assessment of dried food products is based on their rehydration in a liquid buffer before diluting and spreading for cultivability measurement. However, the rehydration mode, and particularly rehydration kinetics, could drastically impact the cultivability measurement and could lead to erroneous estimation of pathogenic bacteria. This may pose a risk for the consumer due to an underestimation of pathogenic bacteria. Moreover, dried foods are often rehydrated by the user and therefore the impact of rehydration could also directly impact food contamination and consumer health.

Low-moisture foods are not sterile, therefore they can be involved in foodborne outbreaks. For example, *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and also *Cronobacter sakazakii*, are implicated in outbreaks linked low-moisture foods, such as spices, flour, powdered infant formula (PIF) or herbs (8, 43, 74, 292). Among bacteria found in dried food products, *Salmonella enterica* is one of the most represented foodborne bacteria every year across the world. Regarding *Cronobacter sakazakii*, even if incidence is low, it is involved in neonatal meningitis with a death rate up to 80%, hence the importance of assessing microbial contamination.

In the present study, we aimed to distinguish the effects of drying alone from the effects of the successive and necessary rehydration in order to investigate the effect of rehydration kinetics after drying on the survival of three pathogens: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii*.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Bacterial strains

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 DSM 10506, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Senftenberg 772W DSM 10062 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T strains were used for this study. Bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 37 °C (+/− 0.1 °C) for 24 h, subsequently five colonies of each bacterium were inoculated in 50 mL of Tryptic Soya Broth (TSB, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and incubated for 8 h at 37 °C (+/− 0.1 °C). Suspensions were then diluted in 50 mL of fresh TSB in order to adjust an Optical Density at 600 nm (OD_{600}, measured by using a Thermo Scientific, Spectronic 200, Villebon sur Yvette, France) of 0.01 (corresponding approximately to 10^6 CFU/mL) before incubation for 14 h at 37 °C (+/− 0.1 °C) to reach stationary growth phase cultures.

2.3.2. Drying conditions

2.3.2.1. Drying atmosphere

For the desiccation of the cellular suspensions, hermetic plastic boxes (20 × 13 × 6 cm) were used, with saturated salt solutions at the bottom which regulated the a_W and therefore the atmosphere RH. Saturated salt solution of lithium chloride, potassium acetate, potassium carbonate and magnesium nitrate (all from Sigma-Aldrich) were used to reach an a_W of 0.11, 0.25, 0.44 and 0.58, respectively, checked using an a_W-meter (+/− 0.003) (Aqualab, Dardilly, France). In the hermetic boxes, a_W permitted to maintain a RH of 11%, 25%, 44% and 58%, respectively, checked with RH sensors (+/− 0.5% RH) (Lascar, Radiospare, France). Internal atmospheres were stirred using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) and all experiments were performed at room temperature.

2.3.2.2. Preparation of the initial cell suspension

The cell concentration of the stationary growth phase culture was checked and adjusted to 1×10^8 CFU/mL through the measurement of the OD_{600}. 25 mL of each culture were centrifuged (3,400 g, 10 min at 25 °C, Eppendorf 5810 R, Montesson, France) and washed twice with an equal volume of PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier,

France). In a final step, the supernatant was removed and cell pellets were suspended in 25 mL of PBS. The final bacterial number was checked by measuring OD_{600}. The final cells counts were determined by plating on TSA. Plates were incubated for 24 h at 37 °C (+/− 0.1 °C) and bacterial concentration was expressed in CFU/mL (Colony Forming Unit/mL).

2.3.3. Rehydration impact after different drying intensities

2.3.3.1. Drying and instantaneous rehydration

For each experiment, a droplet (10 µL) of bacterial suspensions was spread in a thin layer onto a glass Petri dish (with 3 cm diameter) which was placed at 58%, 44%, 25% and 11% RH during 90 min. After the desiccation, cells were rehydrated by instantaneous (1 s) addition of 990 µL of PBS (a_W = 0.995, checked using an a_W-meter) and homogenization by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France). Then, cells were diluted in PBS (a_W = 0.995) and counted by plating on TSA (a_W = 0.995) incubated for 24 h at 37 °C (+/− 0.1 °C) (**Figure 31 (a)**).

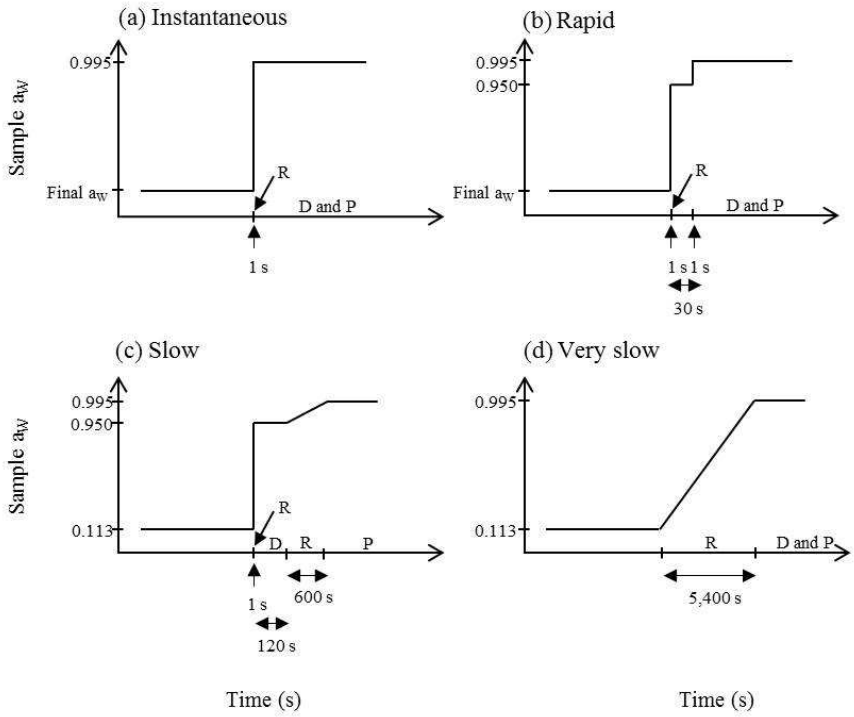

Figure 31: Scheme of different rehydration methods used in this study. (a) Instantaneous rehydration in PBS at 0.995 for 1 s. (b) Rapid rehydration in cPBS (concentrated PBS) at 0.950 (about 1 s), holding time at 0.950 for 30 s and diluting in PBS at 0.995 for 1 s before plating. (c) Slow rehydration in cPBS at 0.950 for 1 s and holding at 0.950 by diluting in cPBS for 2 min before plating during which ramp rehydration (i.e. a progressive evolution of rehydration level) occurred on Petri dishes for about 10 min to reach an a_W of 0.995. (d) Very slow rehydration by placing bacteria in a 100% RH atmosphere for 90 min before diluting and plating. R: Rehydration. D: Dilution. P: Plating. Even if only drying at an a_W of 0.11 was presented, rehydration presented in (a) and (b) were also performed to reach an a_W of 0.58, 0.44 and 0.25 in atmosphere RH at 58%, 44% and 25%.

2.3.3.2. Drying and rapid rehydration

Droplets (10 µL) of same bacterial suspensions were dried in the same way as for instantaneous rehydration. After the drying, cells were rehydrated by addition of 990 µL of concentrated PBS (noted cPBS, $a_W = 0.950$, checked using an a_W-meter) and homogenized by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France), corresponding to the first rehydration step. The use of cPBS ($a_W = 0.950$) resulted in the partial rehydration of bacterial cells up to an a_W of 0.950 (compared to PBS with $a_W = 0.995$) imposing a supplementary step before total rehydration of the bacterial cells at an a_W of 0.995. After 30 s, for the second step, dilution was performed in PBS ($a_W = 0.995$) and counted by plating on TSA ($a_W = 0.995$) incubated for 24 h at 37 °C (+/− 0.1 °C) (**Figure 31 (b)**).

2.3.3.3. Drastic drying and slow rehydration rates

Droplets (10 µL) of bacterial suspensions were spread in thin layer on glass. They were placed at 11% RH for 90 min, i.e. the more drastic drying condition. After the drying, cells were rehydrated by two other complementary methods: (i) a slow rehydration was performed such as previously in cPBS but the successive dilution were performed in cPBS to maintain bacteria at 0.950, 10 µL of each dilution was dropped on a TSA plate with an $a_W = 0.995$ (see **Figure 31 (c)** for the corresponding scheme). This drop on the TSA media involved then a linear increase of the cell suspension a_W (from 0.950 to 0.995). Cells were counted by plating on TSA incubated for 24 h at 37 °C (+/− 0.1°C). The second complementary rehydration method is (ii) a very slow rehydration which was performed by placing dried bacteria in an atmosphere maintained at 100% RH (checked using an RH sensor) thanks to vapor transfer from distilled water at room temperature for 90 min permitting bacteria to reach an a_W of 0.995. Cells were then homogenized by pipetting and then counted by diluting in PBS ($a_W = 0.995$) and plating on TSA incubated for 24 h at 37 °C (+/− 0.1°C) (see **Figure 31 (d)** for the corresponding scheme).

2.3.4. Statistical analysis

The loss of cultivability was expressed in $\log_{10}(N/N_0)$, where N represents the bacterial concentration (CFU/mL) after the drying/rehydration cycle and N_0 represents the bacterial concentration (CFU/mL) before stress, for each condition. All experiments were performed in completely independent triplicates, from independent subcultures and cultures. With the purpose of comparing the various results obtained in this study, first the variance homogeneity (F-test) was tested and then (if $p > 0.05$) an ANOVA or a t-test were performed. For significant ANOVA, Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was achieved. Analyses were performed on R software.

2.4. Results

2.4.1. Rehydration impact after different drying intensities

After drying at different RH, bacteria were rehydrated in two different manners: (i) instantaneous rehydration and (ii) rapid rehydration (**Figure 31 (a) and (b)**). The loss of cultivability after drying and rehydration is represented in **Figure 32**. A significant difference was observed in bacteria survival with a significant effect of species (ANOVA, $p < 0.05$) and a highly significant effect of rehydration (ANOVA, $p < 0.01$).

Concerning *S.* Typhimurium (**Figure 32 (B)**), the loss of cultivability was higher when instantaneous rehydration was used than when rapid rehydration was used.

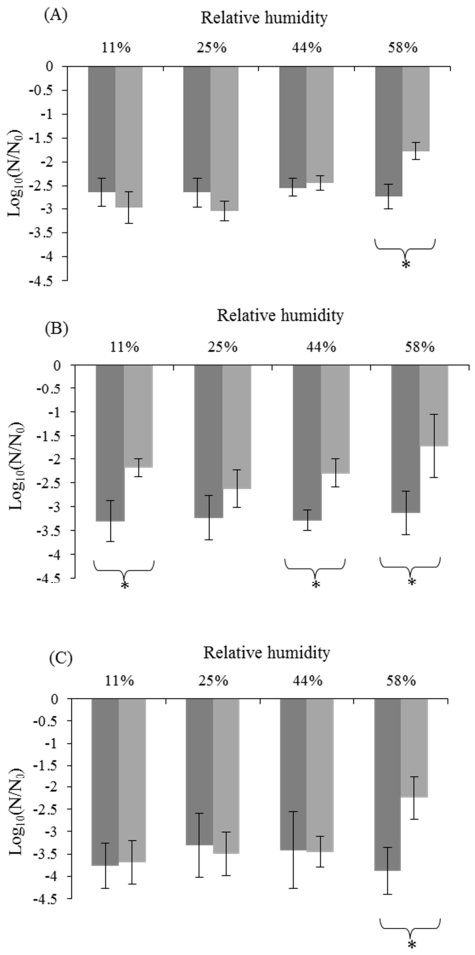

Figure 32: Impact of rehydration after drying on cultivability for *C. sakazakii* (A), *S.* Typhimurium (B) and *S.* Senftenberg (C). Dark grey represents the loss of cultivability obtained with instantaneous rehydration and light grey represents the loss of cultivability with rapid rehydration. Error bars represent SD calculated from triplicates and asterisks represent a significant difference between both conditions (t-test, $p<0.05$). The corresponding dataset was presented in S1 Table.

A significant difference ($p < 0.05$) was detected between both rehydration conditions after a drying at 11% RH, 44% RH and 58% RH. In the cases of *C. sakazakii* (**Figure 32 (A)**) and of *S.*

Senftenberg (**Figure 32 (C)**), on the other hand, a significant difference ($p < 0.05$) was only observed in the 58% RH condition, with a more important loss of cultivability after an instantaneous rehydration than after a rapid rehydration.

2.4.2. Rehydration impact after a drastic drying

In order to explore the effect of rehydration kinetics, two supplementary types of slower rehydration were then performed after drying in drastic conditions (11% RH): (i) slow rehydration and (ii) very slow rehydration (**Figure 31 (c) and (d)**). The data for loss of cultivability obtained with these new rehydration modes were compared with the previous results obtained with instantaneous and rapid rehydration in the same drying conditions (11% RH) and presented in **Figure 33**. A highly significant difference was observed for loss of cultivability in the four rehydration kinetics (ANOVA, $p < 0.001$).

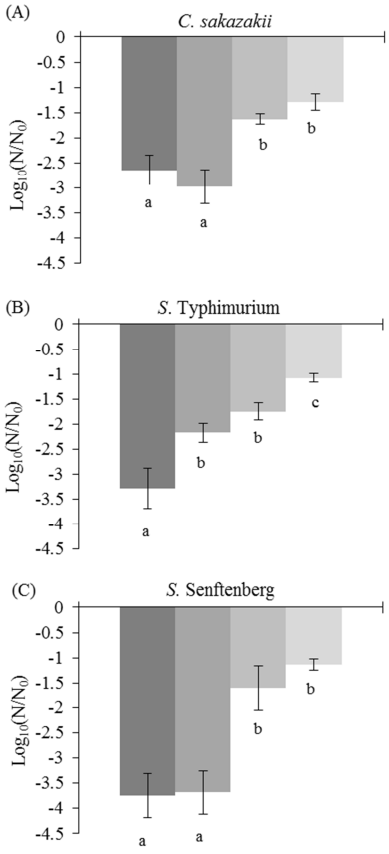

Figure 33: Comparison of four rehydration kinetics after 90 min of drying in an atmosphere at 11% RH for *C. sakazakii* (A), *S.* Typhimurium (B) and *S.* Senftenberg (C). The loss of cultivability obtained with instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration is shown going from darker to lighter. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p<0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test. The corresponding dataset was presented in S2 Table.

For *S.* Typhimurium (**Figure 33 (B)**), differences among loss of cultivability were observed using instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration, with no difference between rapid and

slow rehydration. A difference of 2 log was observed when comparing the two extreme rehydration modes: instantaneous and very slow rehydration. Regarding *S.* Senftenberg (**Figure 33 (C)**), differences in loss of cultivability were observed in the different rehydration modes used in this study. Two groups were significantly different ($p < 0.05$), represented by the two fastest rehydration kinetics and the two slowest rehydration kinetics. The difference between the instantaneous and very slow rehydration modes represented 2.7 log. Concerning *C. sakazakii* (**Figure 33 (A)**), results similar to those observed for *S.* Senftenberg were obtained. A difference of 1.25 log was noted between instantaneous and very slow rehydration.

Consequently, the rehydration kinetics was primarily responsible for the loss of cultivability obtained after a drying/rehydration cycle.

2.5. Discussion

These results obtained in our study clearly show that the inactivation usually and totally attributed to drying is in fact due to a combination of drying and of rehydration. This phenomenon has previously been observed in probiotics (293), lactic acid bacteria (149) or yeast (146, 148). However, few studies have considered the rehydration of pathogens, such as in surface rehydration (147) or in model media (142). In the present case, we could clearly assess the impact of rehydration on dried foodborne pathogens through the observed difference of loss of cultivability between the faster and slower rehydration modes. The slower the rehydration kinetics, the smaller the loss of cultivability was. Such a conclusion could raise two issues. The first one concerns the rehydration performed in classical microbiological food analyses which is often similar to the instantaneous rehydration presented in this study. Indeed, the inactivation of microorganisms during this rehydration would lead to an underestimation of the pathogenic load present in the food and, therefore, to an increased risk for consumers' health. The second one concerns the different personal consumer practices in terms of dried food product rehydration which could also have important consequences on further pathogen survival in the rehydrated product.

Two phenomena occurring during the drying phase could possibly explain this significant loss of cultivability due to fast rehydration kinetics. One is the cell membrane folding followed by an intracellular vesiculation which occurs during drastic drying when water exits the cell swiftly. Plasma membrane vesiculation has already been observed and reported in previous work, both on yeasts and bacteria (101, 142, 146). Indeed, this phenomenon leads to a decrease in the area of membrane. During fast rehydration, water rapidly enters the cell which tends to recover its original volume but the membrane ruptures because of its reduced surface. During the slow rehydration of cells, as used in this work, the internal vesicles would have time to reincorporate the membrane and so to prevent the cell from rupture. The other phenomenon which could be

considered to explain our observations is related to osmotic solutes or active ion input in the cell during the first phase of drying (100, 269, 294). This solute accumulation would involve a supplementary water input during the rehydration which leads to a greater cell volume than the initial one and so to cell rupture. Indeed, in case of instantaneous rehydration, this water input is not compensated by the simultaneous solute and ion output from the cell which have very slow rates of diffusion across the cell membrane (about 100-fold less than water) (295). Compared to instantaneous rehydration, the rapid rehydration modes used in this study would give the cell time for these solutes or ions to exit and so to recover its initial volume after total rehydration (101). It could be interesting to evaluate to what extent each phenomenon destroys the cells.

After drying followed by very slow rehydration, no significant differences were observed between loss of cultivability of *S*. Typhimurium, *S*. Senftenberg and *C. sakazakii*, which reached near 1 log for each species (**Figure 33**). Contrarily, with instantaneous rehydration, a significant difference was observed between the loss of cultivability of each specie, where *C. sakazakii* was more resistant than *S*. Typhimurium and *S*. Senftenberg. Until now, *C. sakazakii* has been known as an *Enterobacteriaceae* which is highly resistant to drying and more resistant than Salmonella enterica (8, 269, 282). The results presented in this study suggest that the very slow rehydration mode erases the difference in loss of cultivability of the bacterial species. Consequently, it is possible to think that *C. sakazakii* is more resistant to rehydration than *S*. enterica and, consequently, not more resistant to drying by itself, maybe explaining by the different capsular properties of the strains.

2.6. Conclusion

Interestingly, the results presented in this study suggest that the impact of drying on the inactivation of pathogen is associated to rehydration kinetics. Indeed, instantaneous rehydration is responsible for the extend inactivation during the drying-rehydration process. Two hypotheses were proposed to understand the role of rehydration kinetics and it seems that appropriate management of rehydration and particularly fast rehydration could enhance the negative effects of drying/rehydration on pathogen cultivability. Rehydration is an important step when cultivability is assessed, impacting the estimation of bacterial contamination and consumer risk. In light of the above conclusions, rehydration after drying has to be normalized during routine microbial analyses in order to avoid underestimating the microbial load in dried food products. During food safety analyses, rehydration procedures need to be standardized. Likewise, instructions for an optimal rehydration during the use of dried food have to be provided to the consumer. In the future, we suggest that rehydration has to be considered with more attention; further works would consider other foodborne pathogens and the influence of the nature of different dried food products.

3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons observé l'impact de la réhydratation sur la perte de cultivabilité de *Salmonella enterica* sérotypes Typhimurium et Senftenberg ainsi que de *Cronobacter sakazakii*. Il est clairement montré que, dans le PBS, la réhydratation est responsable de la majorité de l'inactivation bactérienne induite par un procédé de séchage/réhydratation. Les résultats montrent qu'une réhydratation rapide de bactéries dans un milieu sec provoque une inactivation maximale des cellules et qu'une réhydratation lente peut préserver la cultivabilité d'une majorité de cellules et ceci pour un même niveau de séchage. Des manipulations complémentaires nous ont montré que l'effet de la réhydratation est moins marqué dans le lait. Ce substrat permet donc de limiter l'inactivation bactérienne au cours du séchage (Chapitre 1) ainsi qu'au cours de la réhydratation. C'est pour cela que nous l'avons retenu pour évaluer l'effet du traitement thermique (Chapitre 3).

Chapitre 3

Décontamination Thermique de Microorganismes Pathogènes sur une Poudre Alimentaire et Modélisation des Données

1. Introduction

La plupart des produits secs, dont le lait en poudre, sont réhydratés ou ajoutés à d'autres ingrédients aqueux. En conséquence, une contamination microbienne résiduelle pourrait alors évoluer et conduire à des problèmes sanitaires si les produits ne sont pas consommés rapidement (8, 74, 85, 86, 262, 263).

Afin d'assurer la qualité microbiologique du produit et donc la sécurité du consommateur, certains procédés de décontamination sont utilisés pour réduire la charge microbienne du produit alimentaire et impliquent une étape de chauffage pendant un temps donné. De la constatation que la perte microbienne à haute température entre le temps t et t + dt est proportionnelle à la charge microbienne à l'instant t et au temps de traitement, un modèle loglinéaire permettant d'établir la valeur de stérilisation (D et z) peut être utilisé pour décrire l'inactivation bactérienne au cours du traitement thermique (227, 234). Ce modèle est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire et un grand nombre de valeurs de D_T sont disponibles dans la littérature pour les milieux liquides. Néanmoins, dans ces milieux liquides, l'activité de l'eau pourrait être considérée comme constante et très proche de 1. Les propriétés thermiques de l'eau permettent d'appliquer facilement et de façon quasi homogène un traitement thermique en contrôlant précisément la température. Ce n'est pas le cas des produits secs qui sont fortement hétérogènes avec, notamment, la présence d'air qui est un isolant thermique. De plus, la décontamination thermique des produits secs est difficile à prévoir en raison de leur hétérogénéité mais également en fonction de la flore microbienne à inactiver (221). Deux stratégies sont envisageables. La première est de réaliser des expériences en fonction de l'a_W et de la température pour proposer un modèle permettant de construire des combinaisons de barème temps, température et a_W de façon analogue aux milieux liquides. La deuxième stratégie est de rechercher des traceurs biologiques, c'est-à-dire des microorganismes qui miment le comportement de pathogènes au cours d'un traitement thermique.

Les objectifs de ce chapitre sont donc :

- Evaluer l'impact des facteurs a_W, temps et température sur l'inactivation des bactéries pathogènes alimentaires étudiées
- Proposer des barèmes de traitement thermique pour les industries agroalimentaires des produits secs
- Sélectionner des traceurs biologiques

Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique soumis dans le journal *International Journal of Food Microbiology* : LANG, E., CHEMLAL, L., MOLIN, P., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., PERRIER-CORNET, JM., DANTIGNY, P., ET GERVAIS, P. (2016). **Thermal inactivation of dried foodborne pathogens in milk powder.**

2. Thermal inactivation of dried foodborne pathogens in milk powder

LANG, E., CHEMLAL, L., MOLIN, P., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., PERRIER-CORNET, JM., DANTIGNY, P., ET GERVAIS, P.

2.1. Highlights

Effects of the temperature and a_w on decimal reduction were analyzed.
Thermal inactivation of foodborne pathogens was optimized in milk powder.
A predictive modelling for pathogen thermal inactivation was built in milk powder.
Time/temperature/a_w treatments were designed for foodborne pathogens in milk powder.

2.2. Abstract

Due to the ability of foodborne pathogens to survive in low moisture food, the decontamination of milk powder is an important issue in food protection. Until now, empirical way was mainly used to achieve such decontamination. This work is untended to bring some elements allowing rationalizing thermal treatment. The effect of thermal treatments on the inactivation of dried *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Senftenberg, *Cronobacter sakazakii*, *and Escherichia coli* was assessed. Bacteria were mixed with whole milk powder and dried until different water activity level (0.11, 0.25, 0.44 and 0.58). The rate of inactivated bacteria was determined after thermal treatments at 85°C, 90°C, 95°C and 100°C, from 0 s to 180 s in closed vessels, in order to maintain a_w during treatments. In a first step, logarithmic bacterial inactivation was fitted by a classical loglinear model in which temperature and a_w have a significant effect ($p < 0.05$). $D_{T,\,aw}$ values were estimated for each T, a_w condition and results showed clearly that a_w is a major parameter to take into account for the thermal decontamination of dried foods, lower a_w involving greater thermal resistance. In a second step, the Bigelow's law was used to determine z_T, classical parameter relative to the temperature, and y_{aw} values, new parameter relative to a_w resistance. Results also showed that the most resistant bacterium to temperature variations is *Salmonella* Typhimurium, while the most resistant bacterium to a_w variations is *Escherichia coli*. These data will help designing decontamination protocols or processes in closed batches for low moisture foods.

2.3. Keywords

Salmonella Typhimurium, *Salmonella* Senftenberg, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, predictive microbiology, low water activity food

2.4. Introduction

Low water activity (a_w) foods are defined by a water activity value under 0.70 which prevents any further microbial development and they represent 80% of food products inside food industry (8, 10). Water activity, which varies between 0 (no water) and 1 (pure water), represents the water available for biochemical, biological and, physiological reactions and this parameter is of primary importance to establish inactivation scale regarding low moisture food. Indeed, under a threshold of 0.70, no microorganisms can grow and for bacteria, a first growth is observed in media with an a_w upper than 0.87. It is the reason why a_w is largely used as a reference to limit pathogens development in food products (11) and also to reduce the pathogen contamination (147, 296).

Most of the low a_w foods are not consumed in the dry and powdered form and are rehydrated or added to other aqueous ingredients. Accordingly, a residual microbial contamination could then evolve and lead to sanitary problems. Low a_w foods are generally obtained from agricultural raw materials by fragmentation, separation and drying processes (10). Among low a_w food, whole milk powder production represents a very large production (2.5 million tons per years in European Union) (297) which is directly consumed or included in formulation of several food products such as dairy food, cakes, cereal products, chocolate and infant formula (74), providing properties, such as nutritional, texture or flavor qualities. Even if milk was pasteurized, the further drying and conditioning process could involve cross-contamination of milk powder (11, 234, 298).

This is well illustrated by outbreaks concerning milk powder and products comprising milk powder for which several pathogens were involved gram-positive as well as gram-negative bacteria. Vegetative pathogens associated with dried milk products were principally *Salmonella* spp. and also *Staphylococcus aureus* and *Cronobacter sakazakii*. For example, *S. enterica* was incriminated in infant dried milk product in 1985 and 1996 in United-Kingdom, in powdered infant formula in 1993, 2008 and 2011 in Canada, USA and France and also in powdered milk in 1973 in Trinidad. Regarding *C. sakazakii*, outbreaks implicated powdered infant formula in 1986, 1988, 1998, 2001 and 2007 in Iceland, USA, Belgium and New Zealand. All these outbreaks affect infants and can be lethal (8, 74, 85, 86, 262, 263).

In order to provide a good microbial quality and insure consumer food safety, some decontamination processes are used to decrease the microbial load of food product (11, 12). Many decontamination processes of liquid or aqueous food products involved heating step and more exactly a time-temperature couple in order to provide decontamination scales (227, 234). From the basic consideration that the microbial loss at high temperature between times t and t + dt is proportional to the microbial load at t and to the treatment time, a loglinear model

permitting to establish sterilization value (D and z) can be used to describe the inactivation of bacteria over heat treatment. D-value or decimal reduction time represents the time necessary to reduce the population by ten-fold (1 log) and z-value represents the temperature increase necessary to reduce the D value by ten (227). The loglinear model is largely used in food industry and a great number of D-values, relative to different temperatures, is available in literature for liquid media, such as milk or fruit juices (227). Nevertheless, in these liquid media, a_w could be considered as constant and very close to 1. The thermal properties of water permit to apply easily and homogeneously heat treatment and, to control precisely the temperature, during thermal process, which is not the case for dried food. Moreover, other models could be used, such as Weibull model which permits to integrate an inactivation decrease rate for high temperature as a border phenomenon (299).

Thermal decontamination process of dried food products, like milk powder, is difficult to predict due to adapted large variability of microflora and heterogeneous thermal property of dried foods (220, 221). Indeed, some investigations report the increased resistance in low moisture food of *S. enterica, Escherichia coli* or *C. sakazakii* on different food substrates. For example, in the case of *S.* Waltevreden in flour, a decrease of a_w from 0.40 to 0.10 involved an increase of the D_T value by a factor of 30 (300). At low a_w, an increased thermal resistance is generally observed for several microorganisms, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* or *Salmonella enterica* (219, 220, 301).

The objective of the present study was to model the effects of time, temperature and a_w on the thermal inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii* in milk powder. With this purpose, we performed heat treatment (85°C, 90°C, 95°C and 100°C) of whole milk powder inoculated with the previous foodborne pathogens at different constant a_w levels (0.11, 0.25, 0.44 and 0.58). We used of the loglinear model classically used in food industry, permitting to determine the log reduction time $D_{T,aw}$ for each bacteria and each temperature and a_w couples. Then, the Bigelow model was used to evaluate the effect of temperature (through z_T) and a_w (through y_{aw}, a new parameter) for foodborne pathogens.

2.5. Materials and methods

2.5.1. Bacterial strains and cultivations conditions

Escherichia coli K12TG1, Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium DT104 DSM 10506, Salmonella enterica subspecies enterica serovar Senftenberg 775W DSM 10062 and Cronobacter sakazakii CIP 103183T strains were used for this study. All cultures were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich) at -80°C. For

recovery, bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich) at 37°C for 24 h, subsequently five colonies of each bacterium were picked up in 50 mL of Tryptic Soya Broth (TSB, Sigma-Aldrich) and incubated for 8 h at 37°C. Suspensions were then diluted in 50 mL of new TSB in order to reach an Optical Density (OD) of 0.01 at 600 nm. Cultures in stationary phase were obtained after 20 h at 37 °C.

2.5.2. Inoculation of powder

For both bacteria, cell concentration was checked and adjusted to 1×10^8 CFU/mL through the measurement of the OD_{600}. 50 mL cultures were centrifuged (3,400 g, 10 min at 25°C) and washed twice with 25 mL of PBS. In a final step, supernatant was removed and cell pellets were weighed. Milk powder (26% fat, a_w = 0.44, Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) was added to pellet with a 1:20 ratio (w_{pellet}:w_{powder}) and homogenized through a mortar. An inoculated milk powder was obtained with an a_W of about 0.80.

2.5.3. Drying process

To dry inoculated milk powder, hermetic boxes, with saturated salt solutions at the bottom to regulate the a_w and by consequence the atmosphere RH, were used. Lithium chloride (LiCl, Sigma-Aldrich) to obtain an a_w of 0.11 (corresponding to a RH of 11%), potassium acetate to reach an a_w of 0.25 (corresponding to a RH of 25%), potassium carbonate to obtain an a_w of 0.44 (corresponding to a RH of 44%) and finally sodium bromide (all from Sigma-Aldrich) to have an a_w of 0.58 (corresponding to a RH of 58%) were used. Atmospheres were maintained under convection using a fan (Sunon, Radiospare, France) as described in previous work (276). For each bacterium, inoculated milk powder was spread on four Petri dishes, with near 5 g per Petri dish, and was placed without the lid inside hermetic boxes for 16 h in order to reach the final a_w level. All drying processes were performed at room temperature.

2.5.4. Thermal treatment

0.1 g of dried inoculated milk powder were put into 0.2 mL closed tube and treated at different holding temperature (85°C, 90°C, 95°C and 100°C) during a given time (0 s, 30 s, 60 s, 90s, 120 s and 180 s) using a thermocycler (Bioer, France). Samples were then cooled at 4°C to stop the impact of thermal treatment. It is well known that a_w of most food products (such as powdered infant formula) at the same water content slightly increases with temperature (302). As the a_w measurement is very complicated at elevated temperature (6), all the a_w values proposed in this work were performed at 25°C (initial a_w). Milk powder was rehydrated by addition of 1 mL of PBS and agitation for 30 s. Counting by CFU were performed after incubation in TSA media for 24 h at 37°C and results were expressed as $\log_{10}(N/N_0)$, where N represented the CFU after

thermal treatment and N_0 represented the initial contamination of drying inoculated milk powder.

2.5.5. Model building

2.5.5.1. Primary modelling

The thermal inactivation of the four Enterobacteriaceae was evaluated for each temperature and each a_w by the measurement of the loss of cultivability. The loglinear model was used for fitting the inactivation data for one couple of a temperature and an a_w (**Equation 17**):

$$log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \left(\frac{-t}{D_{T,aw}}\right) (17)$$

where t (s) is the time and $D_{T,aw}$ (s) is the decimal reduction time at temperature T (°C) and at the water activity a_w.

2.5.5.2. Secondary modelling

2.5.5.2.1. Effect of temperature

The effect of temperature on the efficiency of the treatment was modeled for each bacterium using the Bigelow model (**Equation 18**):

$$log_{10}\left(\frac{D_{T,aw}}{D_{T^*,aw}}\right) = -\frac{T-T^*}{z_T} (18)$$

where $D_{T,aw}$ (s) represented the decimal reduction time at the temperature T (°C), $D_{T^*,aw}$ (s) represented the decimal reduction time at the reference temperature T* (°C). In our experiments, T* = 100°C, the highest tested temperature. The thermal effect of the treatment was characterized by z_T (°C) represented the supplementary temperature increase to decrease $D_{T,aw}$ 10-fold.

2.5.5.2.2. Effect of water activity

The effect of a_w on the efficiency of the treatment was modelled for each bacterium through an adaptation of Bigelow model (**Equation 19**):

$$log_{10}\left(\frac{D_{T,aw}}{D_{T,aw^*}}\right) = -\frac{1}{2}\frac{a_w-a_w^*}{y_{aw}} (19)$$

where $D_{T,aw}$ (s) represented the decimal reduction time at the water activity a_w (-), $D_{T,aw}$* (s) represented the decimal reduction time at the reference water activity a_w* (°C). In our experiments, $a_w^* = 0.58$, the highest tested a_w. The a_w effect of the treatment was characterized by y_{aw} (-) which represented the supplementary a_w increase to decrease $D_{T,aw}$ 5-fold (and not 10-

fold as z_T). Such a definition is proposed to prevent values greater than one for y_{aw} variation which are theoretically not possible.

2.5.6. Statistical analyses

All experiments were performed in independent triplicates. The effects of the factors on the thermal treatment were evaluated for each bacterium by analysis of variance (ANOVA) using Matlab R2011b software (Mathworks, USA). Significance was evaluated when p-value was equal or under 0.05; in this case a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions. To illustrate the significant difference among the levels of each treatment parameters, means of $D_{T,aw}$ were calculated on all data for a same parameter level. For example, to observe the significant difference among the tested temperature levels, the means of $D_{T,aw}$ at 85°C, 90°C, 95°C and 100°C were calculated from all $D_{T,aw}$ at each temperature regardless the a_w and the bacterium. The confidence interval (95%) of each mean of $D_{T,aw}$ was calculated from the general variance of all the experimental points.

2.6. Results

Results were divided in two parts presenting, first, the results of the primary modelling, through the loglinear model, and then the secondary modelling, through the adapted Bigelow's law.

2.6.1. Primary modelling

The $D_{T,aw}$ were reported in Table 14 (**Tableau 14**) and bacteria exhibited different resistance to thermal treatments.

Tableau 14 : $D_{T,aw}$ values for four *Enterobacteriaceae* inactivated in milk powder at different water activities

		Escherichia coli		*Salmonella* Typhimurium		*Salmonella* Senftenberg		*Cronobacter sakazakii*	
Temperature	a_w	$D_{T,aw}$ (s)	95% CI	$D_{T,aw}$ (s)	95% CI	$D_{T,aw}$ (s)	95% CI	$D_{T,aw}$ (s)	95% CI
85°C	0.11	139	112; 183	127	97.7; 180	156	132; 192	122	108; 141
	0.25	115	92.2; 152	87.9	73.4; 110	137	112; 176	100	92.0; 110
	0.44	66	58.2; 76.2	63.2	54.0; 76.2	66.8	57.7; 79.3	63.1	56.0; 72.3
	0.58	60.5	51.1; 73.9	42.5	39.0; 46.7	56.4	50.5; 63.8	54	50.5; 58.1
90°C	0.11	76.1	64.9; 91.9	87.8	74.4; 107	97.4	82.0; 120	102	86.4; 123
	0.25	68.8	60.9; 79.1	65.8	55.9; 79.8	95	81.8; 113	88.4	79.3; 99.8
	0.44	45.9	41.2; 51.7	46.4	40.4; 54.6	52	47.7; 57.1	51	45.9; 57.3
	0.58	36.3	33.1; 40.3	32.3	29.4; 35.9	37.3	34.5; 40.8	41.7	37.5; 47.1
95°C	0.11	47.7	41.5; 56.1	81.6	71.0; 96.0	94.3	82.7; 110	62.6	54.5; 73.6
	0.25	45.7	40.6; 52.3	63.1	55.9; 72.5	72.4	65.5; 81.0	54.4	46.2; 66.2
	0.44	34.1	31.2; 37.6	41.8	36.0; 49.7	45.1	41.8; 49.0	40.6	36.3; 46.0
	0.58	32.4	29.2; 36.2	34.7	31.8; 38.1	30.3	27.0; 34.5	32.9	29.4; 37.3
100°C	0.11	34.1	31.2; 37.5	65.8	52.8; 87.2	67.3	58.5; 79.1	50.3	45.7; 56.0
	0.25	31.1	27.5; 35.7	43.6	38.4; 50.3	51.4	45.0; 59.9	47.9	43.6; 53.1
	0.44	24.3	21.7; 27.7	33.1	29.7; 37.3	37.6	32.5; 44.6	36.5	31.2; 44.0
	0.58	19.7	17.6; 22.4	29.5	26.5; 33.2	23.3	20.6; 26.7	33.2	29.1; 38.7

Results showed that this resistance was greatly influenced by treatment conditions. The maximal resistance was observed for the driest condition and the lowest heating temperature, i.e. T = 85°C and a_w = 0.11, with no significant difference among bacterial species, $D_{85,0.11}$ values were 139 s, 127 s, 156 s and 122 s for *E. coli*, *S.* Typhimurium, *S.* Senftenberg and *C. sakazakii*, respectively. The minimal resistance was observed for the highest a_w condition and the highest heating temperature, i.e. T = 100°C and a_w = 0.58, $D_{100,0.58}$ values were 19.7 s, 29.5 s, 23.3 s and 33.2 s for *E. coli*, *S.* Typhimurium, *S.* Senftenberg and *C. sakazakii*, respectively. More generally, an ANOVA test was performed on all data and revealed a significant effect of the bacterial strain ($p < 0.05$), a_w ($p < 0.001$) and the temperature ($p < 0.001$) on the efficiency of the thermal inactivation of bacteria. For the lowest temperature (85°C), no significant difference among bacteria was observed at an a_w of 0.11 but a significant difference was observed for an aw of 0.58; *E. coli* was the most resistant and *S.* Typhimurium the less resistant. *S.* Senftenberg and *C. sakazakii* were both not significantly different from *E. coli* and *S.* Typhimurium. At 100°C, significant differences among bacteria were observed at an a_w of 0.11; *S.* Senftenberg is significantly more resistant than *C. sakazakii* and *E. coli*, both significantly different between them. *S.* Typhimurium $D_{T,aw}$ value was not different from those of *S.* Senftenberg and *C. sakazakii* in the previous condition. Also, at an a_w of 0.58 and at 100°C, *C. sakazakii* was the most resistant and *E. coli* the less resistant. *Salmonella* serovars presented intermediate $D_{T,aw}$ values. *S.* Typhimurium was not different *C. sakazakii* and *S.* Senftenberg, which are significantly different from *C. sakazakii* but not from *E. coli*. Overall, *S.* Senftenberg presented highest $D_{T,aw}$ values and *E. coli* the lowest $D_{T,aw}$ values. Also, more differences were observed for the highest temperature (100°C) and less significant differences were observed for the lowest temperature (85°C).

The respective influence of both parameters on the $D_{T,aw}$ values was represented in **Figure 34**. Means of $D_{T,aw}$ were calculated on all data as function of factor presented on the vertical axis. For example, in the case of **Figure 34 (a)**, the mean of $D_{T,aw}$ at 85°C was calculated from all $D_{T,aw}$ at 85°C regardless the a_w and the bacterium. For temperature (**Figure 34 (a)**) and a_w (**Figure 34 (b)**), all factor levels were clearly significantly different. For bacterial effect (**Figure 34 (c)**), *S.* Senftenberg was significantly different to the other bacteria with a higher $D_{T,aw}$ mean and was the most resistant bacterium. *C. sakazakii* was not significantly different to *S.* Typhimurium but was different to *E. coli*. *S.* Typhimurium and *E. coli* were not significantly different. *E. coli* had the lower $D_{T,aw}$ mean, i.e. it was the least resistant bacteria.

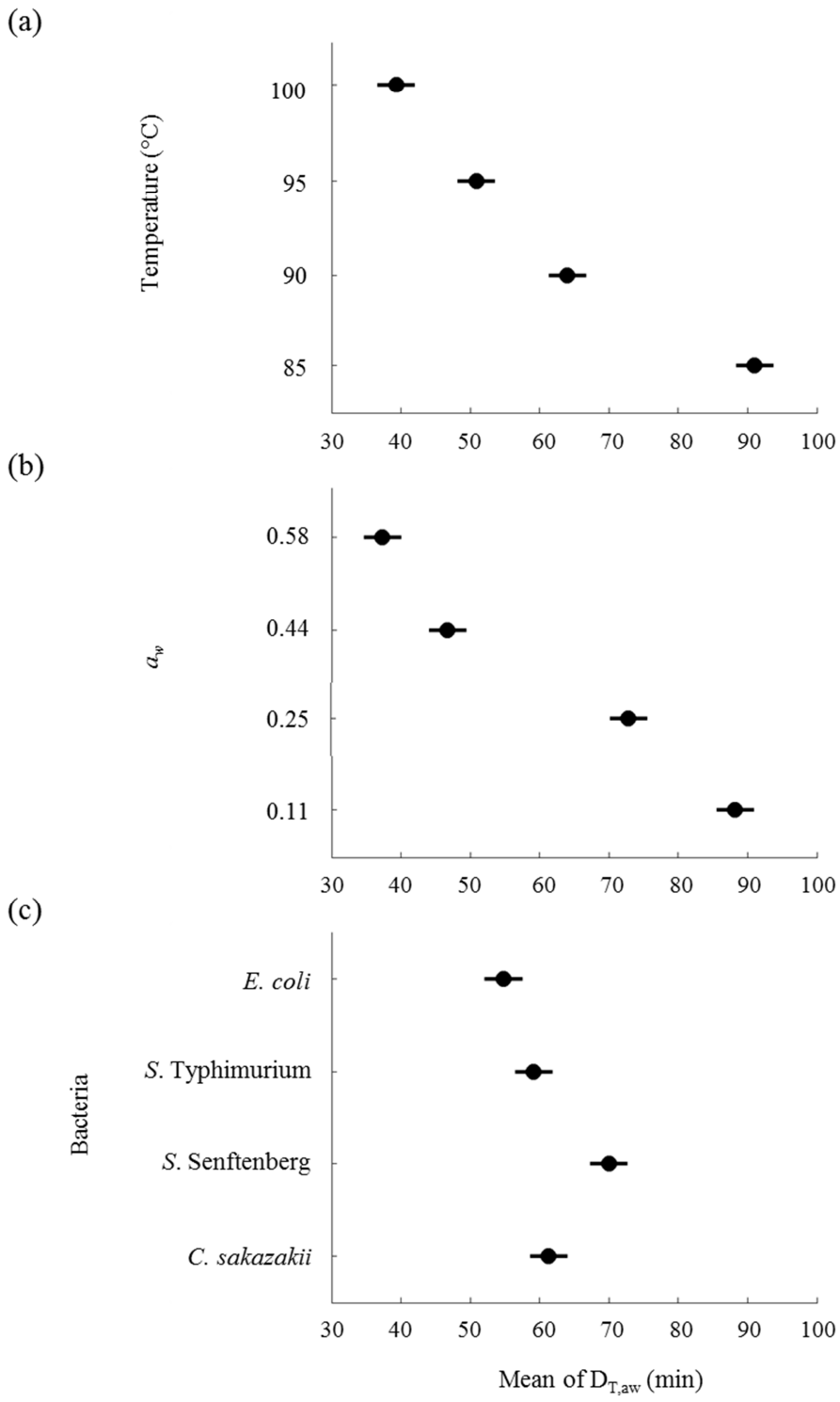

Figure 34 : Representation of effect of temperature, a_w, and bacteria on $D_{T,aw}$ value. (a) Impact of temperature, (b) impact of a_w, and (c) impact of bacteria. Means of $D_{T,aw}$ (●) and bars represents confidence interval (95%). Means of $D_{T,aw}$ were calculated on all data for a same parameter level. The confidence interval of each mean of $D_{T,aw}$ was calculated from the general variance of all the experimental points.

2.6.2. Effect of temperature and water activity on the efficiency of the thermal inactivation of bacteria in milk powder: secondary modelling – adapted from the Bigelow model

In order to compare the impact of each parameter (temperature and a_w), the Bigelow model, a classical secondary model, was used.

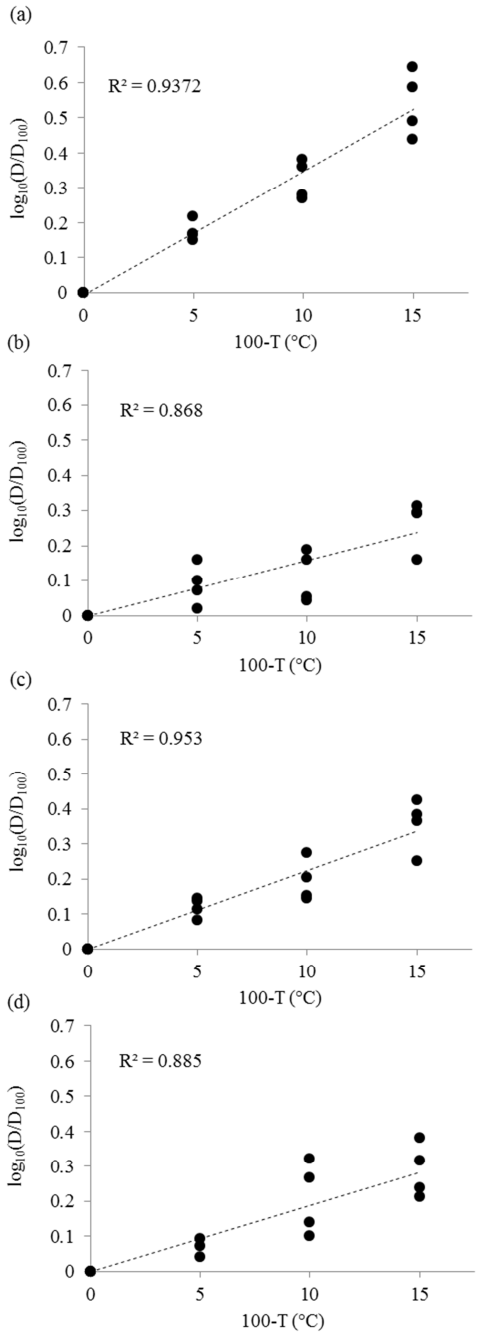

Figure 35 : Linear regression for the determination of z_T (°C) for each bacterium. Experimental points (●) and linear regression (– – –) were represented for *Escherichia coli* (a), *Salmonella* Typhimurium (b), *Salmonella* Senftenberg (c) and *Cronobacter sakazakii* (d).

This model was intended to estimate respectively z_T (the temperature increase allowing to decrease $D_{T,aw}$ ten-fold) and y_{aw} (the aw increase allowing to decrease $D_{T,aw}$ value five-fold), both parameters defined previously. The quality of the secondary modelling could be apprehended through the R^2 coefficient values of the loglinear regression realized on the $D_{T,aw}$ values as a function of temperature (**Figure 35**) for z_T and of a_w (**Figure 36**) for z_{aw} increases. R^2 values were comprised between 0.7-0.8 for two modelling, 0.8-0.9 for three modelling and 0.9-1.0 for the last three modelling. Consequently, the fitting of this secondary modelling can be considered as exploitable.

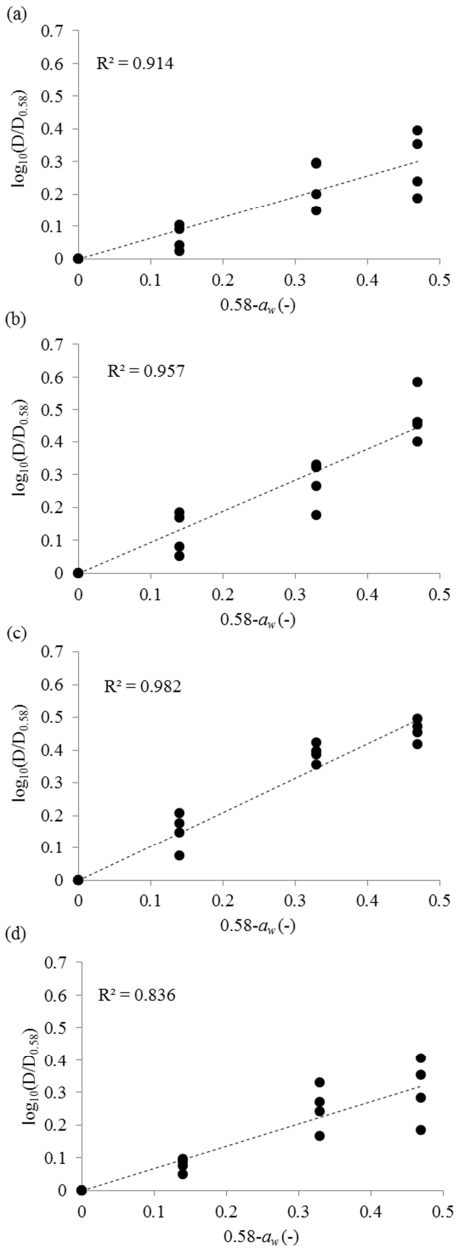

Figure 36 : Linear regression for the determination of y_{aw} (-) for each bacterium. Experimental points (●) and linear regression (– – –) were represented for *Escherichia coli* (a), *Salmonella* Typhimurium (b), *Salmonella* Senftenberg (c) and *Cronobacter sakazakii* (d).

Results of the secondary modelling were reported in Table 15 (**Tableau 15**). Bacteria exhibited different resistances to the temperature evolution during thermal treatments. Indeed, *S.* Typhimurium was found to be the most resistant specie to temperature variation with a z_T = 62.2°C. No significant difference was observed with *C. sakazakii* which had a z_T = 52.8°C but significant differences were observed with *S.* Senftenberg and *E. coli* with z_T = 44.3°C and z_T = 29.3°C, respectively. *E. coli* was significantly less resistant to temperature variation in milk powder during heat treatment than the other bacteria. In the same way, bacteria showed different resistances to the a_w level of the milk powder during thermal treatment. *E. coli* and *C. sakazakii* showed to be more resistant to a_w changes with a y_{aw} = 0.830 and y_{aw} = 0.755, respectively. These y_{aw} were significantly different for *S.* Typhimurium (y_{aw} = 0.595) and *S.* Senftenberg y_{aw} (y_{aw} = 0.488). *S.* Typhimurium was more resistant to temperature fluctuation than *E. coli* but the contrary observation was done for the resistance to a_w fluctuation.

Tableau 15 : z_T and y_{aw} values of four *Enterobacteriaceae* in whole milk powder at different temperatures and water activities determined by the Bigelow model.

Species	z_T (°C)	95% CI	y_{aw} (-)	95% CI
Escherichia coli	29.6[a]	27.4; 32.1	0.830[a]	0.750; 0.990
Salmonella Typhimurium	62.2[b]	52.8; 75.7	0.595[b,c]	0.540; 0.665
Salmonella Senftenberg	44.3[c]	50.6; 39.4	0.488[d]	0.455; 0.525
Cronobacter sakazakii	52.8[bc]	44.3; 65.5	0.755[a,c]	0.655; 0.890

CI: Confidence Intervals
Different superscript letters indicate significant differences between the estimated z_T or y_{aw} values

2.7. Discussion

In this study, an estimation of bacterial inactivation of four *Enterobacteriaceae* to thermal process in dried milk powder was performed. Heating was applied from 85°C to 100°C in order not to denature organoleptic and nutritional properties of milk powder. For each treatment, a_w was maintained at a fixed level comprised between 0.11 and 0.58, representing diversified values of dried food products (8), and in this range 0.25 corresponds to the native milk powder a_w. Even it is known that the decrease of a_w increases the D_T value (230, 303) and that a_w is an important parameter (219, 220), few modelling proposed the a_w as a factor affecting the thermal inactivation of foodborne pathogens. Heat resistance of bacteria is also greatly influenced by environmental conditions such as pH, salt concentration, redox potential or a_w. Leguerinel *et al.* (1) showed that the pH of thermal treatment impacted on *S.* Typhimurium inactivation, with an inactivation increase when pH was decreased, and they defined a new parameter z_{pH}. In our study, we focused on a_w impact on dried foodborne pathogen inactivation.

In such cases of low a_w food, a modelling through Weibull model was often used to model the impact of temperature (304, 305). Here, through comparison of R^2 values of each model, we

found that the loglinear model fit better the experimental points than the Weibull model (data not shown). This permitted us to estimate $D_{T,aw}$ and z_T values and propose a new parameter y_{aw} (equivalent to z_T but relative to a_w), representing the influence of a_w on heat inactivation. In our experiments, all heat treatments were carried out in closed tubes and consequently, the sample a_w was stable during the treatment. This could explain the difference between our study and other ones which performed heat treatment in open containers. In such cases, during heating, a drying occurs and decreases the a_w of the samples and the bacteria which became more resistant and inactivation kinetics reach then an asymptotic limit which is well represented by Weibull model (299).

The use of time and temperature is performed since many years in aqueous media, such as tin can sterilization and pasteurization process (227, 299). The $D_{T,aw}$ values found in this study can be compared with D_T values obtained in aqueous media. As in liquid media higher the temperature, the smaller the $D_{T,aw}$ was (**Tableau 14**). In reconstituted whole milk powder, a D_{58} = 40 s and a z_T = 4.0°C have been reported for *Cronobacter* spp. (306). For *Salmonella* spp., $D_{59.5}$ = 160 s and a z_T = 4.6-5.1°C were found in liquid milk. Finally, for *E. coli*, $D_{59.5}$ = 42 s and z_T = 4.6-5.1°C is noted in liquid milk (156). These D_T values for liquid products are clearly lower than the values found for dried milk in our study. In the same way, for each bacterium, the z_T found in our study are more than 10-fold higher than the values found in aqueous media (156, 306). This information strengthens the well-known fact that low a_w largely increases the thermal resistance of bacteria (220).

From the results, and particularly from **Figure 34**, it comes that the a_w level is a major parameter of bacterial heat inactivation in dried state (6). In the study on peanut butter of He *et al.* (2013), the author found an impact of a_w on inactivation of three serovars of *Salmonella* (of which *S.* Typhimurium). In this fatty acid rich product, *S.* Typhimurium presented D_{90} values of 223 s and 117 s at a_w levels of 0.20 and 0.80, respectively (218). We found, in closed vessels, D_{90} of 87.8 s and 65.8 s for milk powder at a_w level of 0.11 and 0.25, respectively. This different D_{90} values could be attributed to the different food product compositions. This singular resistance to heat in dried state can be attributed to two major and complementary factors. The first one is the low molecular mobility consecutive to the low water content. Disulfide and hydrogen bonds breaking and active site injuries due to the thermal treatment are reduced, preventing heat denaturation of biomolecules essential to vital bioprocesses (274). Indeed, thermal treatment involved molecular vibrations which are reduced in low a_w environment. This low water motibity also generates a transition phase change of bacterial phospholipids. Indeed, the membrane phase corresponding to physiological activity is a liquid crystalline phase, but this phase is greatly influenced by environmental parameters such as temperature or reduced a_w

(307). Membrane phospholipids change into liquid state to high order state as function a_w and these could affect bacterial capacity to survive stresses (308). The different membrane composition, which could also influence the transition phase of the phospholipids belonging to bacterial membranes, may explain the different bacteria inactivation observed here (290, 309). The second main factor is the active phenomenon of cross-protection by activation of bacterial genetic and metabolic pathway during the transition to dried state (102, 151). This cross protection to stress is well known for *S. enterica*. Indeed, previous work had shown that desiccation stress involved a large synthesis of Heat Shock Proteins which protect protein conformations by preventing thermal damages on their structure and active sites (107). These two singularities enhance the bacterial resistance to further environmental perturbation and consequently could explain the increased resistance to heat treatment.

The usual predictive inactivation data were essentially based on high a_w media and additional analyses are necessary to predict microbial inactivation in low-a_w food (300). If some data already exist concerning *Salmonella* spp. or *E. coli*, few data are available for other vegetative foodborne pathogens like *C. sakazakii*.

2.8. Conclusion

This study proposed a modelling of four *Enterobacteriaceae* inactivation in whole milk powder at different a_w levels during thermal treatment. $D_{T,aw}$ were evaluated for four constant temperatures (85, 90, 95 and 100°C) and four constant a_w levels (0.11, 0.25, 0.44 and 0.58). Then, z_T value was calculated and a new parameter y_{aw} was proposed to describe the impact of a_w level on bacterial inactivation. Our results demonstrate that inactivation is bacterial dependent, with *S.* Typhimurium more resistant to heat variation than the others and *E. coli* more resistant to a_w variation. All these results permit to propose a model allowing to control the pathogen inactivation in whole milk powder using the application of a time-temperature-treatment and consequently to insure food safety for four *Enterobacteriaceae*. A new explaining factor of the bacterial resistance relating to a_w (y_{aw}) was defined which leads to treat the milk powder in a closed atmosphere in order to prevent any a_w decrease during treatment. Nevertheless, the proposed model is only applicable to milk powder and has to be experimentally adapted to others food product before use. Some other works could be done to determine the optimal values for other foodborne pathogens, i.e. temperature and a_w of treatment in others food products. Finally, considering that thermal treatment in open vessel will involve a pathogens drying and therefore will increase their resistance, it could be interesting to develop new thermal processes or protocols for dried food product using closed batches.

2.9. Acknowledgement

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie and Novolyze which are gratefully acknowledged.

3. Isolement de bactéries environnementales et détermination de leur potentiel en tant que traceurs biologiques

De potentiels traceurs biologiques ont été isolés de matières premières de l'entreprise partenaire. Rapidement, des échantillons de produits ont été traités thermiquement (95°C, 15 min) puis la flore bactérienne résistante a été récupérée par réhydratation rapide dans du PBS concentré (voir Chapitre 2) avant d'effectuer des étalements sur gélose VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar), milieu sélectif aux entérobactéries. Dans le cadre du développement de traceurs biologiques, il a été choisi de travailler sur la famille phylogénétique contenant *S. enterica* et *C. sakazakii* présentant un phénotype proche de bactéries pathogènes. Les colonies présentes sur VRBG ont été isolées sur géloses TSA avant d'être identifiées en réalisant un séquençage de l'ADNr 16S suivit d'un BLASTn (comparaison de séquence nucléotidique par alignement) sur le site du NCBI. Les isolats présentant un risque pour la santé humaine ont été écartés. Par la suite, pour déterminer leur potentiel comme traceurs biologiques, des traitements thermiques à 90°C sur de la poudre de lait à une a_W de 0,25 ont été réalisés (voir Chapitre 3 **section 2**). Un traitement thermique d'une poudre contenant *E. faecium* ATCC 8459, souvent utilisé comme traceur biologique, a été réalisé en parallèle.

Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 37**, représentant la diminution logarithmique de l'isolat ainsi que celle des pathogènes étudiés. Dans tous les cas sauf pour *E. faecium* (**Figure 37 (a)**), une diminution de la cultivabilité est observée en fonction du temps. Dans le cas de *E. faecium*, il n'y a qu'une très faible perte de cultivabilité. Les profils d'inactivation peuvent ainsi être comparés pour déterminer si les isolats sont de bons traceurs biologiques pour l'un des pathogènes étudiés.

Il ressort que Novo1631EC6 (**Figure 37 (e)**), Novo1631EM2 (**Figure 37 (g)**), Novo1631EC3 (**Figure 37 (c)**) et Novo1631EM3 (**Figure 37 (h)**) sont des traceurs biologiques potentiels pour *S.* Senftenberg et/ou *S.* Typhimurium. En effet, l'inactivation de ces derniers est similaire et légèrement supérieure à celle de *S.* Senftenberg et/ou *S.* Typhimurium. Par contre, sur toute la durée du traitement, il n'y a pas de traceurs adaptés pour *C. sakazakii*.

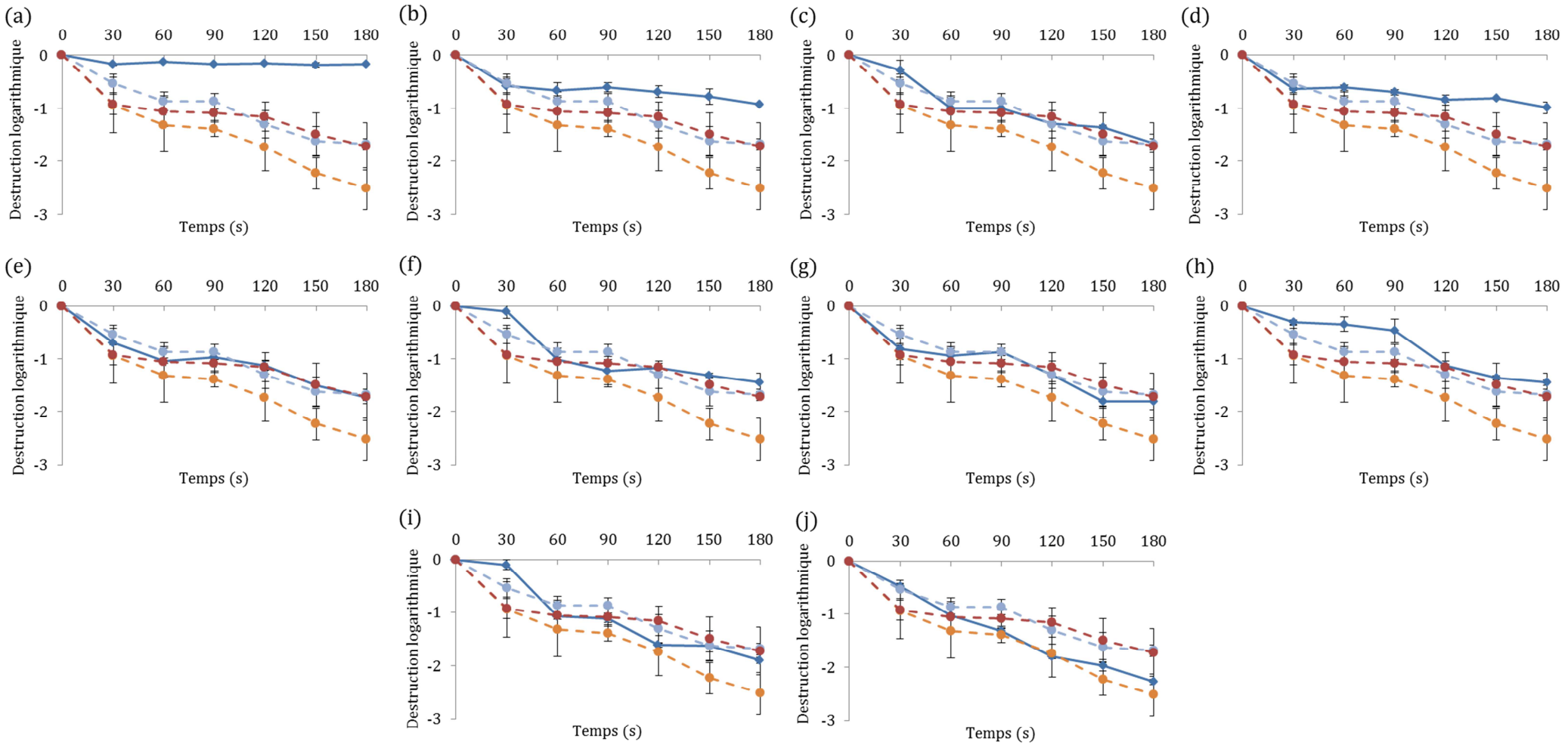

Figure 37 : Présentation des résistances thermiques des traceurs biologiques testés et des pathogènes. En bleu trait plein : le traceur testé, En bleu clair et pointillé : *C. sakazakii*, En bordeaux et pointillé : *S.* Senftenberg, En orange et pointillé : *S.* Tuphimurium. (a) *E. faecium*, (b) Novo1631EC1, (c) Novo1631EC3, (d) Novo1631EC5, (e) Novo1631EC6, (f) Novo1631EM1, (g) Novo1631EM2, (h) Novo1631EM3, (i) Novo1631EM4 et (j) Novo1631EM5

Pour compléter cette comparaison, il est possible de comparer les $D_{90,0,25}$ des traceurs biologiques potentiels et des pathogènes pour s'assurer de leur fiabilité (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Ensemble des $D_{90,0.25}$ pour les pathogènes étudiés et les traceurs biologiques potentiels. En rouge : les pathogènes étudiés. En vert : les traceurs biologiques sélectionnés en fonction de leur profil d'inactivation dans de la poudre de lait à une activité de l'eau de 0.25 pendant un traitement thermique à 90°C

Espèces	Valeur de $D_{90,0,25}$ (s)	Ecart-type
Salmonella Typhimurium	65,8	13,9
Escherichia coli	68,8	11,2
Novo13631EM5	73,6	4,57
Novo13631EM4	86,8	9,83
Cronobacter sakazakii	88,4	12,8
Novo1631EM2	91,2	13,3
Salmonella Senftenberg	95,0	18,7
Novo1631EC6	97,1	12,3
Novo13631EC3	98,1	10,9
Novo13631EM1	108	17,7
Novo13631EM3	124	14,2
Novo1631EC5	157	30,3
Novo13631EC1	171	35,0
Enterococcus faecium	746	190

Il est possible de constater que lors d'un traitement thermique, plusieurs traceurs biologiques potentiels (en vert dans le **Tableau 16**) ont un $D_{90,0,25}$ plus élevé que ceux des pathogènes étudiés (en rouge dans le **Tableau 16**). Ils pourraient donc convenir pour mimer leur comportement dans les mêmes conditions de traitement thermique. Il faut également noter que trois des traceurs biologiques choisis en fonction de leur profil d'inactivation thermique présentent également un $D_{90,0,25}$ supérieur à celui des pathogènes. Ils peuvent ainsi être de bons traceurs biologiques des pathogènes cibles.

Pour aller plus loin, d'autres études de traitements thermiques doivent également être effectuées pour s'assurer que les traceurs biologiques choisis conservent cette propriété en fonction des paramètres du produit, notamment de l'a_W. De plus, il est possible de noter que *E. faecium* n'est pas adapté et présente une résistance bien supérieure alors que cette espèce est actuellement considérée et utilisée comme traceur biologique de *S. enterica*. Il faudrait également envisager de tester ces traceurs sur des systèmes pilotes pour s'assurer de leur fiabilité à grande échelle.

4. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, des traitements thermiques ont été effectués sur de la poudre de lait inoculée avec quatre bactéries différentes. Grâce au modèle loglinéaire classiquement utilisé en industrie, des valeurs de $D_{T,aw}$ ont été calculées pour quatre températures et quatre a_W. De plus, grâce à une modélisation secondaire, des valeurs de z_T ont été calculées pour chaque bactérie. Un nouveau paramètre analogue à z_T est proposé pour l'a_W dans notre modèle : y_{aw}, qui représente l'impact de l'a_W sur la résistance bactérienne et qui permet notamment de prédire le rôle de l'activité de l'eau lors d'un traitement thermique à l'état sec. Nos résultats montrent nettement que dans le cas d'un traitement thermique d'un produit sec, il est important de ne pas sécher le produit pendant le traitement de décontamination car une réduction de l'activité de l'eau engendre une perte d'efficacité du traitement thermique. De ce fait, il est logique d'envisager des procédés de décontamination de produits secs en vase clos permettant ainsi d'éviter un séchage supplémentaire des produits. Enfin, des traitements thermiques effectués sur des isolats environnementaux ont permis de proposer des traceurs biologiques potentiels pour *Salmonella enterica*. Il est également intéressant d'étudier les causes de l'inactivation bactérienne (Chapitre 4) pendant le traitement thermique des produits secs, aujourd'hui mal connues, afin de pouvoir par la suite optimiser le traitement thermique.

Chapitre 4

Mécanismes Cellulaires Impliqués dans l'Inactivation des Bactéries Pathogènes lors d'un Séchage et d'un Traitement Thermique Successifs

1. Introduction

Le séchage et le traitement thermique sont deux perturbations environnementales rencontrées par les pathogènes lors de la production des produits alimentaires secs. Le traitement thermique est un moyen classique pour réduire la charge microbienne, largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire.

Les mécanismes d'inactivation bactérienne dans les milieux liquides sont bien compris. En effet, en milieu liquide, les traitements thermiques engendrent une rupture de la membrane externe des bactéries Gram-négatives mais aussi pour perturber la stabilité de la membrane interne. De même, les protéines sont dénaturées par un traitement thermique qui provoque la rupture des liaisons impliquées dans la structure fonctionnelle (246, 248, 310). A plus grande échelle, l'ensemble de ces dommages engendre une diminution de la population ou de la communauté bactérienne. Pour les produits secs, l'impact du traitement thermique est mal connu et une meilleure connaissance des phénomènes impliqués dans l'inactivation bactérienne pourrait permettre d'optimiser les traitements thermiques tout en conservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit traité en fixant des barèmes adaptés.

Dans ce chapitre, l'effet d'un séchage et d'un traitement thermique successif est évalué sur l'intégrité de la membrane et l'activité enzymatique de *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhimurium et serovar Senftenberg dans le lait en poudre.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- Comprendre les phénomènes physiologiques en lien avec l'inactivation bactérienne pendant le séchage
- Comprendre les phénomènes physiologiques en lien avec l'inactivation bactérienne pendant le traitement thermique successif au séchage

Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique en préparation : LANG, E., ZOZ F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., PERRIER-CORNET, J.M. ET GERVAIS, P. (2016). **Cellular injuries of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* exposed to drying and successive heat treatment**

2. Cellular injuries of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* exposed to drying and successive heat treatment

LANG, E., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., PERRIER-CORNET, J.M. AND GERVAIS, P.

2.1. Abstract

Due to the ability of foodborne pathogens to survive in low moisture food, their decontamination is an important issue in food protection. This work is intended to bring some elements of understanding cellular mechanisms involved in foodborne pathogen inactivation after drying and then after heating in dried state. *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Senftenberg and *Cronobacter sakazakii* were mixed into whole milk powder and dried at different water activity level (0.25 and 0.58) and the number of survivors was determined after drying and subsequent thermal treatments in closed vessels at 90°C and 100°C, for 0 s, 30 s and 120 s. For each condition, percentage of uncultivable cells was estimated and, in parallel, membrane permeability and enzymatic activity were estimated by flow cytometry. After drying, it was clearly observable that percentages of uncultivable cells were correlated with percentage of permeabilized cell and, in a less proportion, with percentages of cells presenting loss of enzymatic activity. On the contrary, the percentages of uncultivable cells observed after heat treatment were strongly correlated with the loss of enzymatic activity and weekly with the membrane permeability occurrence. Consequently, it could be concluded that the cell inactivation during drying is closely linked to the membrane permeabilization and that heat treatment of dried cells affect principally the enzymatic activity which legitimizes the use of time-temperature scales. These data permit to better understand cellular mechanism of bacterial death during drying and following heat treatment in dried state. All this information can also afford a better to optimization of the decontamination process in order to insure food safety by targeting the most deleterious condition for bacterial cells without denaturing the food product qualities.

2.2. Keywords

Salmonella enterica, *Cronobacter sakazakii*, permeability, enzymatic activity, heat treatment, drying

2.3. Introduction

Salmonella enterica and *Cronobacter sakazakii* are Gram-negative, facultative anaerobic, motile, nonspore-forming bacteria which causes human disease (8). They are of major concern in infant feeding industry (234). Indeed, the first bacterium is a major pathogen in the food industry as

very few microbial cells ingested by young children (10–100 cells) will cause severe illness (311). The second one can cause severe infections such as meningitis, bacteremia, and necrotizing enterocolitis in infants with a death rate up to 80% (312).

Foodborne pathogens encounter many stresses in food processing environments and food products. Drying is one of them and takes place during low moisture food production. It consists in a diminution of environmental water activity (a_w) which represents the available water for chemical and biochemical reactions (264). During a desiccation, the water evaporation involved two mains cellular stresses (99). The first one corresponds to the increase of solute concentration and the osmotic pressure in the external environment which induces a water outlet from the cell (99, 101). The second one corresponds to the complete water evaporation where bacteria undergo an oxidative stress due to the exposition with atmospheric oxygen in dried state (99, 101). Bacteria have several resistance mechanisms to osmotic stress which enhance their survival and acclimation which could be active or passive. The passive mechanisms, due to the water outflow, involve molecular desiccation, refolding of such molecules, like enzymes, and protecting them from active site alteration (134). They also engage a membrane phase transition from to gel phase. The active mechanisms, which occurred in the range of physiological water activity (between a_W of 0.999 and 0.940) involved accumulation of ions and counter-ions inside the cell reducing the loss of water before another response permitting the synthesis of compatible solutes, like trehalose for *Salmonella enterica* (14, 102).

Bacteria are more resistant in dried state to further decontamination processes usually used, like heat treatment (219, 221). This particular resistance to the heat in dried state could also be the consequence of the water outflow from the cell involving a very low cell molecular mobility and reducing the effects of further thermal treatment by preventing the breaking of disulfide and hydrogen bonds or by refolding active molecules to prevent active site injury. The increased resistance could also be explained by the active mechanisms taking place during the earlier part of drying which activates metabolic pathways permitting to modify membrane composition and/or protein productions, resulting in cross-protection (14, 27, 102, 151). For example, drying increase thermal resistance of several foodborne pathogens, such as *Salmonella enterica* or *Cronobacter sakazakii*, due to HSP production occurring during drying (27, 100, 313).

Heat is a classical and good means to reduce microbiological load in food and it is widely used in food industry (314). In liquid media, it is well managed since many years and processes are well optimized such as pasteurization or sterilization processes and the mechanisms of bacterial inactivation in liquid media are well understood. In fact, for bacteria, heat treatment in liquid media is known to break the outer membrane of Gram negative, involving irreversible damages (248). Inner membrane is also sensitive to thermal treatment and heating implicates

perturbation of biochemical function of the membrane which is deleterious for bacterial cell (246, 310). Likewise, protein are simultaneously denaturated by heat treatment which causes hydrogen and disulfide bridge breaking and subsequently involves the loss of proteins functional structures (246). These two mechanisms are involved in bacterial cells death during heat treatment in liquid media and result, on a large scale, to inactivation of bacterial population. Contrarily, in dried food, the impact of heat treatment is not well known and improving its knowledge will certainly afford to optimize heat treatments in order to preserve the food qualities, such as aroma, color, vitamins, while assuring food safety. Heat treatments are easily accepted by public opinion at the opposite of other type of treatment, like irradiation (258) and a better understanding could lead to an optimal heating condition establishment, by selecting optimal deleterious treatment settings for bacterial cells, such as optimal temperature.

In this study, the impact of drying and successive heat treatment in dried state is appreciated on the membrane integrity and enzymatic activity of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and serovar Senftenberg in milk powder. Dried was performed until at two different water activity levels (0.25 and 0.58) and heat treatment was carried out at two temperatures (90°C and 100°C) for 0 s, 30 s and 120 s. After treatment, membrane integrity and enzymatic activity were investigated through two fluorescent molecular probes using a flow cytometer.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Strains cultivations

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 DSM 10506, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Senftenberg 775W DSM 10062 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T strains were used for this study. All cultures were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Falavier, France) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich) at -80°C. For recovery, bacteria were inoculated on Tryptic Soy Agar (TSA, Sigma-Aldrich) at 37°C for 24 h, subsequently five colonies of each bacterium were picked up in 50 mL of Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich) and incubated for 8 h at 37°C. Suspensions were then diluted in 50 mL of new TSB in order to reach an Optical Density (OD) of 0.01 at 600 nm. Cultures in stationary phase were obtained after 20 h at 37°C.

2.4.2. Inoculation of powder

50 mL cultures were centrifuged (3,400 g, 10 min at 25°C) and washed twice with 25 mL of Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich). In a final step, supernatant was removed and cell pellets were weighed. Milk powder (26% fat, Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) was added to pellet with a 1:20 ratio (w_{pellet}:w_{powder}) and homogenized through a mortar. An

inoculated milk powder was obtained with an a_W near 0.8. The cultivability of bacteria was estimated by spread plating method after incubation in TSA media for 24 h at 37°C and recorded as CFU/mL.

2.4.3. Drying process

To dry inoculated milk powder, hermetic boxes were used, with saturated salt solutions at the bottom which regulated the a_W and by consequence the atmosphere Relative Humidity (RH). Potassium acetate to reach an a_W of 0.25 (corresponding to a RH of 25%) and sodium bromide (both from Sigma-Aldrich) to have an a_W of 0.58 (corresponding to a RH of 58%) were used. Atmospheres were maintained under convection using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) as described in previous work (276). For each strain, inoculated milk powder was spread on four small Petri dishes, with near 2 g per Petri dish, and was placed without the lid inside hermetic boxes for 16 h in order to reach the final a_W level. All drying were performed at room temperature. Loss of cultivability after drying was expressed in percentage of initial bacterial cells as $(N_1/N_0) \times 100$, where N_1 represents the dried bacterial cell concentration and N_0 represents the initial bacterial cell concentration. The loss of cultivability was also expressed in logarithmic reduction as $\log_{10}(N_1/N_0)$.

2.4.4. Thermal treatment

0.1 g of dried inoculated milk powder were put into 0.2 mL tube and treated at two different holding temperature (90°C and 100°C) for 0 s, 30 s, and 120 s through a thermocycler (Bioer, France). Samples were then cooled at 4°C to stop the impact of thermal treatment. Milk powder was rehydrated by addition of 1 mL of PBS and agitation for 30 s. Loss of cultivability was expressed in percentage of initial dried bacterial cells as $(N_2/N_1) \times 100$, where N_2 represents the final bacterial cell concentration and N_1 represents the dried bacterial cell concentration. The loss of cultivability was also expressed in logarithmic reduction as $\log_{10}(N_2/N_1)$.

2.4.5. Flow cytometry analysis

2.4.5.1. Labelling of bacterial cells

Control, dried, and heated samples were washed before used due to the presence of milk. 1mL of the 10^{-2} dilution (10^6 bacteria/mL) was washed in equal volume of PBS by centrifugation (3,200 g, 5 min, 25°C). Propidium Iodide (PI, Invitrogen, France) and 5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazolium Chloride (CTC, from kit BacLight RedoxSensor, Invitrogen, France) were used in this study to assess the membrane integrity and the respiratory activity, respectively. PI stock solutions were ready for use at 1 mg/mL and CTC stock solution was made up at 50 mM in filtrated distilled water. 300 µL of bacterial suspension was labelled with 3 µL of PI and 3 µL of CTC stock

solutions (final probe concentrations of 10 µg/mL PI and 5 mM CTC), independently. Incubation was performed at room temperature for PI for 20 min and at 37°C for CTC for 30 min.

2.4.5.2. Flow cytometry conditions

Each labelled bacterial suspension was analyzed directly after incubation in an Accuri C6 cytometer (BD accuri, France) with excitation at 488 nm. Detection threshold was set on forward (FSC) scatter signals to reduce electronic and small-particle noise. The optical filter used for both dye was FL2 (585 nm). Typically, signals from 10,000 cells were acquired and analyzed for each sample using the BD accuri Csampler software (v 1.0.264.21, BD accuri, France). The percentages of permeabilized and unrespiring bacteria were adjusted in relation to the control (i.e. 100% of permeabilized bacteria for PI and 100% of unrespiring bacteria for CTC). Assuming that permeabilized and unrespiring bacteria are exclusively inactivated bacteria, we expressed the corresponding percentage as a part of inactivated bacteria only. By consequence, percentages of inactivated bacteria were adjusted to 100% and percentages of permeabilzed and unrespiring bacteria were adjusted in consequence.

2.4.6. Statistical analyses

All experiments were performed in independent triplicates. The effects of the factors on the thermal treatment were evaluated for each bacterium by analysis of variance (ANOVA) using R software (278). Significance was evaluated when p-value was equal or under 0.05.

2.5. Results

Results are presented in two parts: firstly, the effect of drying and, secondly, the heating effect in dried state on the cultivability, the membrane integrity and the enzymatic activity of *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg.

2.5.1. Impact of drying on bacterial cells

The impact of drying on cultivability of each strain at different a_W was presented in **Figure 38**. ANOVA test did not reveal significant difference among values. For *C. sakazakii*, 64.5% (– 0.45 log) and 78.9% (– 0.68 log) of initial bacteria were uncultivable after drying at an a_W of 0.25 and 0.58, respectively. Regarding *S.* Typhimurium, at water activity of 0.25 and 0.58, the uncultivable bacteria represented 74.7% (– 0.60 log) and 77.2% (– 0.65 log) of initial bacteria, respectively. Concerning *S.* Senftenberg, 79.5% (– 0.69 log) and 93.0% (– 1.22 log) of initial bacteria were uncultivable after drying at an a_W of 0.25 and 0.58, respectively.

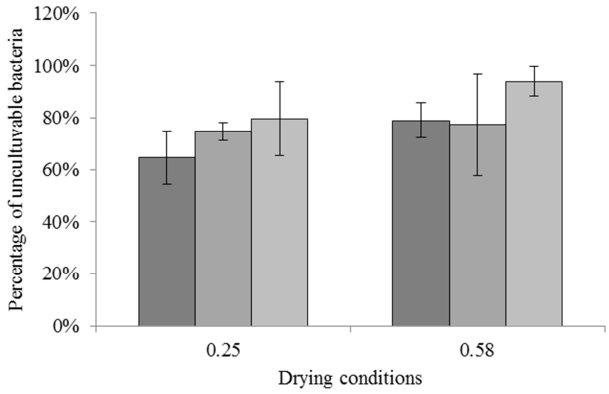

Figure 38: Impact of drying on cultivability. Impact of drying on cultivability for each specie; from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg as function of water activity level of drying. Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates.

The impact of drying on permeability of each strain at different a_W was presented in **Figure 39 (a)**. Results were presented by adjusting uncultivable cell ratio (presented in **Figure 38**) to 100% (**Figure 39 (a)**) and ANOVA test revealed a significant effect of water activity on permeabilized cells percentages. For *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg dried at an $a_W = 0.25$, the percentage of permeabilized cells were about 40.6%, 38.7% and 55.6% of uncultivable cells, respectively. After a drying at an $a_W = 0.58$, the percentage of permeabilized cells were about 65.8%, 50.7% and 63.6% of total uncultivable cells for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively. Between drying at a_W of 0.25 and 0.58, for each strain, a small difference was detected, of 18.2%, 12.4% and 8.00% for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively. The permeabilized cells were slightly more important after a drying at 0.58 than 0.25.

The impact of drying on enzymatic activity, related to loss of respiring capacity, of each strain at different a_W level was presented in **Figure 39 (b)**. Results were also presented by adjusting uncultivable cell to 100%. ANOVA test did not reveal significant difference among conditions. Between drying at an a_W of 0.25 and 0.58, for each strain, a small different of loss of enzymatic activity was observed; from 31.1% to 32.6%, from 45.2% to 36.8% and from 31.5% to 20.5% for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively (**Figure 39 (b)**). For *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg dried at an $a_W = 0.25$, the percentage of unrespiring cells were about 48.1%, 60.7% and 39.7% of uncultivable cells, respectively. After a drying at an $a_W = 0.58$, the percentage of unrespiring cells were about 41.3%, 47.6% and 21.8% of uncultivable cells for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively. Between drying at a_W of an a_W of 0.58 and 0.25, for each strain, a small difference was detected, of 6.8%, 12.8% and 17.9% for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively. The unrespiring cells were more important after a drying at an a_W of 0.25 than 0.58.

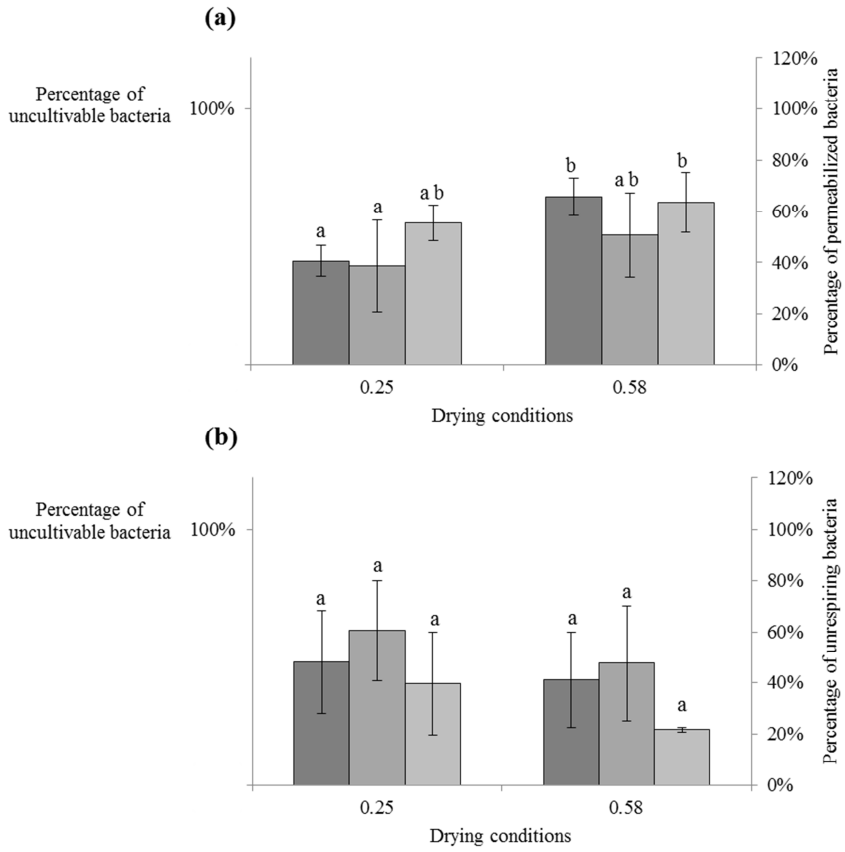

Figure 39: Impact of drying on permeability and enzymatic activity of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. The number of uncultivable cells was so adjusted to 100% (presented on the left); from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, (a) Impact of drying on permeability for each specie reported to uncultivable cells (right axis). (b) Impact of drying on enzymatic activity of each specie reported to uncultivable cells (right axis). Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates.

If percentages of permeabilized and unrespiring bacteria were compared, drying at an $a_W = 0.25$ was represented equally by both bacterial alterations. At an $a_W = 0.58$, uncultivable cells were more represented by permeabilized bacteria than unrespiring bacteria. ANOVA test on all drying data revealed a significant a_W effect but no difference between the two dyes and among bacterial strains.

2.5.2. Impact of heat treatment on bacterial cells

Impact of heat treatment on bacterial cultivability, permeability, and enzymatic activity was presented on **Figure 40** and **41**. The results were obtained for 90°C and 100°C for 30 s and 120 s of treatment in closed vessel. The results obtained after heat treatment were compared with results obtained after drying in order to discern only the impact of heating.

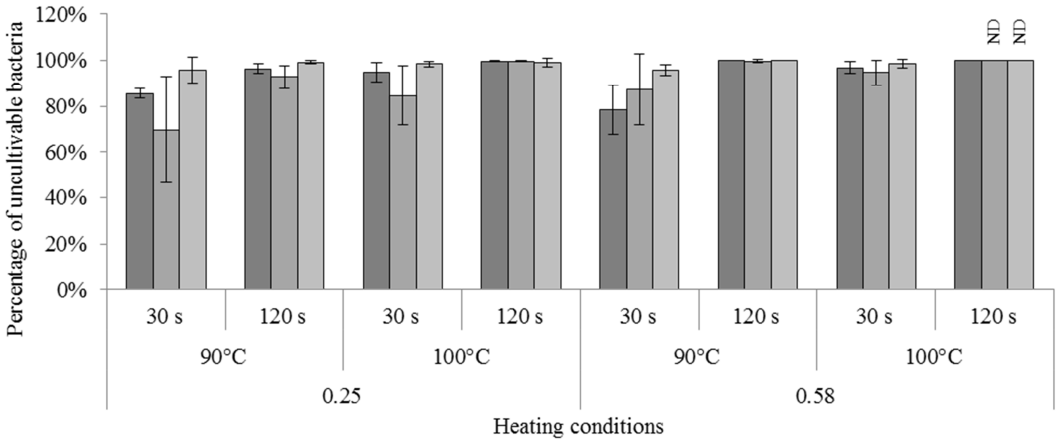

Figure 40: Impact of heating in dried state on cultivability of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. Impact of heat treatment on cultivability for each specie; from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Senftenberg as function of heating conditions, namely water activity of milk powder (0.25 or 0.58), heating temperature (90°C or 100°C) and time of treatment (30 s or 120 s). Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates.

Impact of heat treatment on bacterial cultivability was presented in **Figure 40**. ANOVA test revealed significant effect of temperature, time and strains on the bacterial inactivation. For each bacterium, the uncultivable bacterial cell ratios or loss of cultivability were more important for an $a_W = 0.58$. In the same way, they were more important for high temperature (100°C) and long treatment time (120 s). For each bacterium, the lowest percentage of uncultivable bacteria and loss of cultivability were observed for a milk powder at an a_W of 0.25 treated at 90°C for 30 s. After 120 s at 100°C on a milk powder at 0.58, cultivability of both *Salmonella* serovars were under the detection limit of the method (see **Figure 40**).

The impact of heat treatment on the permeability of each strain for different heating conditions was presented in **Figure 41 (a)**. Results were presented by adjusting uncultivable cell ratios to 100% and subtracting the effect of drying; namely, the percentage of permeabilized cells observed after drying was subtracted to the percentage of permeabilized cells observed after drying and heat treatment to observe only the impact of heat treatment in dried state. ANOVA test revealed a significant effect of strains and time treatment on permeabilized cells percentages. *S.* Senftenberg represented the less permeable bacterium after heat treatment. With the increase of time treatment, the permeability increased. For all strains, the percentage of permeabilized among uncultivable cells represented less than 20% except for heat treatment at 100°C for 120 s for which an increase in permeability was observable. The permeabilized cells were more important after a heat treatment of a milk powder at 0.58 than 0.25 for a same condition. For example, for *S.* Typhimurium treated at 100°C for 120 s, percentage of

permeabilized bacteria represent 28.5% and 41.3% for a milk powder at 0.25 and 0.58, respectively.

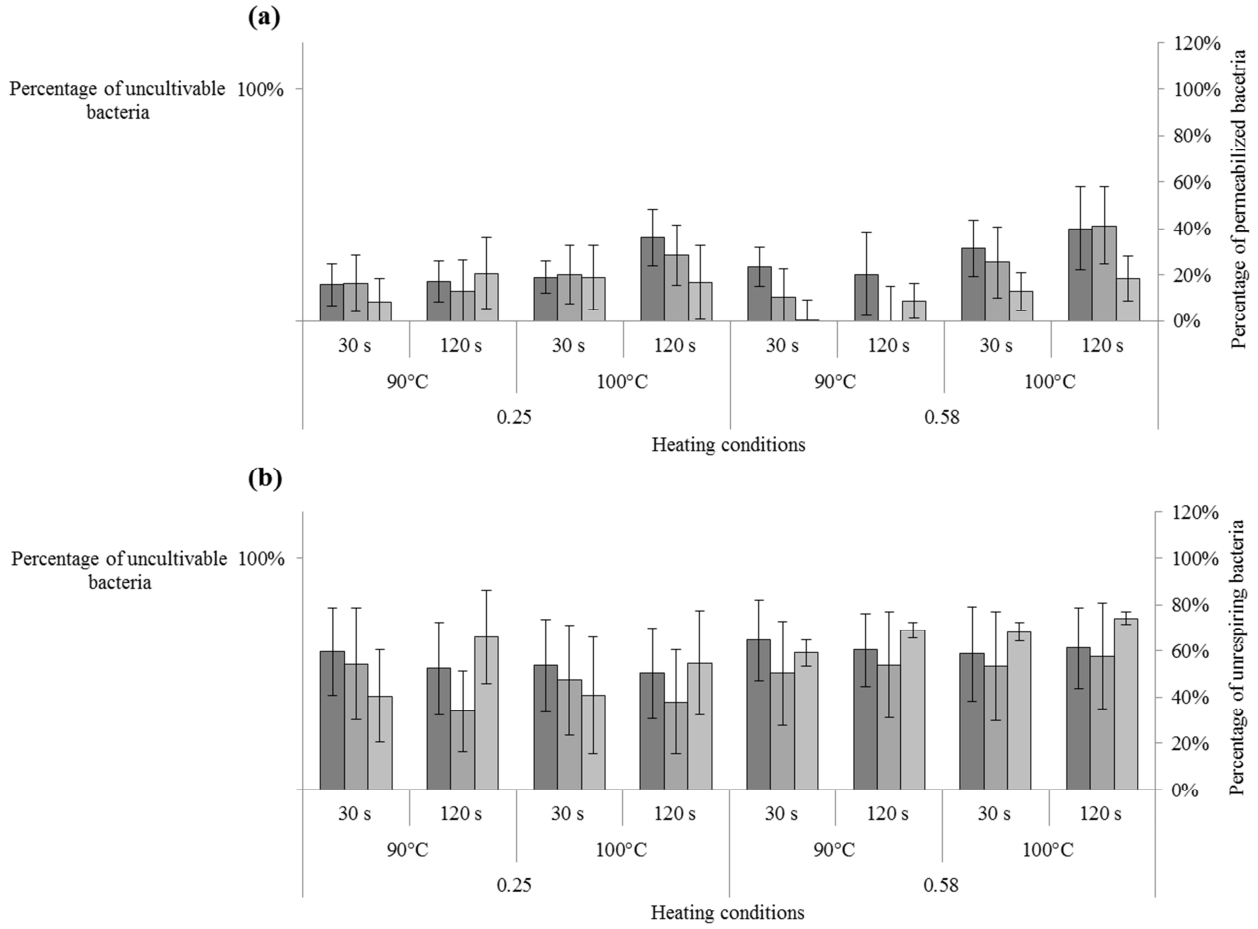

Figure 41: Impact of heating in dried state on permeability and enzymatic activity of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. The number of uncultivable cells was so adjusted to 100% (presented on the left); from darker to lighter, percentages of uncultivable *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg, (a) Impact of heat treatment on permeability for each specie reported to uncultivable cells (right axis). (b) Impact of heat treatment on enzymatic activity of each specie reported to uncultivable cells (right axis). Error bars represent standard deviation obtained on independent triplicates.

The impact of heat treatment on enzymatic activity of each strain for different heating conditions was presented in **Figure 41 (b)**. Results were presented by adjusting uncultivable cell to 100% and subtracting the effect of drying. ANOVA test revealed a significant effect of water activity on bacterial inactivation. More unrespiring bacteria were detected after a heat treatment at $a_W = 0.58$ than at $a_W = 0.25$ For all strains, the percentage of unrespiring bacteria among uncultivable cells represented between 40% and 75% of uncultivable bacteria.

If percentages of permeabilized and unrespiring bacteria were compared, percentages of unrespiring bacteria were much higher than percentages of permeabilized bacteria (from 2 to 5-fold higher). ANOVA test on all drying data revealed a significant a_W effect and a difference

between the two dyes. For example, for *C. sakazakii* heated at 90°C for 30 s in a milk powder at an a_W of 0.58, uncultivable bacteria were represented by 23.5% and 64.5% of permeabilized and unrespiring bacteria, respectively. At 90°C, the sums of percentage of permeabilized and unrespiring bacteria represented between 70% and 90%, 45 and 70% and, 50% and 85% for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively. At 100°C, the sums of percentage of permeabilized and unrespiring bacteria represented between 70% and 100%, 65% and 99% and, 60% and 90% for *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg, respectively.

2.6. Discussion

In this study, the loss of cultivability of three foodborne pathogens was studied after drying and then after heat treatment in dried state. The percentage of bacterial cells which present permeabilized membrane and loss of enzymatic activity after treatment were also evaluated in order to better understand the origin of the loss of cultivability.

The loss of cultivability of each strain after drying was not different after drying at 0.25 and 0.58. Nevertheless, the loss of cultivability is more important after heat treatment at an a_W of 0.58 than at an a_W of 0.25, as shown in a previous study. It is already well known that the decrease in a_W increases the thermal resistance of microorganisms, well demonstrated for *Salmonella enterica*, *Lactobacillus plantarum* and also for *Saccharomyces cerevisae* (220). For example, for heat treatment at 72°C in sucrose solution, the necessary time to *Salmonella* Typhimurium to obtain 3 log decrease dropped from 4.0 min to 1.0 min for an a_W at 0.65 and 0.90, respectively. In our study, *C. sakazakii* appeared as the more resistant specie which was still detectable after a heat treatment at 100°C for 120 s at 0.58 when both *Salmonella* serovars were not detectable (Figure 3). Indeed, *C. sakazakii* is often considered as the more resistant *Enterobacteriaceae* in dried state as found in this study (230).

To study the impact of drying and heat treatment in dried state on bacterial cells, PI and CTC were used. In first hand, the use of PI is well known and used for measure membrane permeability (315). Contrary to eukaryotic cells, no evidence in literature showed that PI is incorporated by non-permeabilized bacterial cells (316). Also, it has been shown on several bacterial species, such as *Microbacterium frederiksbergense*, *Sphingomonas* sp. LB126, *Shewanella oneidensis* MR-1, *Bifidobacterium lactis* and *Shewanella decolorationis* S12, that after long incubation times, bacterial cells are able to repair membrane permeability (317–319). Consequently, as we used it after a short time period at the end of stress, PI permits a good estimation of the membrane permeability. In the other hand, the tetrazolium salts, whose CTC, are often used to detect physiological activity. CTC is a fluorescent marker for the detection of bacterial respiration through dehydrogenase activity (an enzyme of the respiratory chain). In the cellular electron transport system, tetrazolium salts function as artificial redox partners

instead of the final electron acceptor (oxygen); thus, CTC indicates the respiration activity by production of formazan product which is impermeable to cellular membranes (320–323). By consequence, non-fluorescent cells represent dead bacteria due to a loss of membrane integrity or enzymes and protein denaturation. In our case, the use of CTC and PI permits to differentiate the unrespiring bacteria due to a membrane permabilization and due to an enzyme denaturation.

As no difference was detected between the percentage of permeability and the one of unrespiring bacteria, the percentage of unrespiring population can be therefore attributed to permeabilized cells. The link between death during drying and membrane permeability was well studied on *Saccharomyces cerevisiae* by Simonin *et al.* (2007) who observed that membrane permeability largely increases in water-glycerol solutions with osmotic stress and rehydration intensities (146). For *E. coli*, a similar observation was done with formation of vesicles during dehydration (142). Consequently, the authors have proposed that an intense dehydration involved membrane invagination or vesicle which can then lead to membrane permeabilization during rehydration after a drying. The proposed hypothesis is the cellular lyse or permeabilization during rehydration due to the lack of membrane relative surface to vesicle formations. By consequence, this step can promote bacterial permeability (142, 147).

The unexplained percentage of uncultivable cells could be attributed to presence of viable but not cultivable bacteria (VBNC). VBNC bacterial cells respire and present an integer membrane but are not able to develop on classical media (324–326). Notably, *S. enterica* is known to produce VBNC during drying, due to the activation pathway which need RpoS transcription factor also essential for osmotic stress response (324). More than drying, several environmental factors are known to induce VBNC state such as antibiotic pressure, high/low temperature, starvation, chlorination, change in the pH, and oxygen stress. Bacteria can resuscitate from VBNC state with an ideal ratio of carbon source and inorganic elements (324). We can suppose that our conditions for CFU enumeration were not sufficient to activated bacterial cell in VBNC state.

During a heat treatment, in our study, results clearly showed that the loss of cultivability is better explained by loss of enzymatic activity than by loss of membrane integrity. Indeed, as a difference was detected between the percentage of permeability and the one of unrespiring bacteria, the percentage of unrespiring population can be therefore attributed to permeabilized cells. Several causes of loss of cultivability were previously identified for microorganisms after heating in liquid media but no results on pathogen inactivation after heat treatment in dried state were reported until now to our knowledge. Some studies were performed at low water activity in liquid media where the cell inactivation was associated to an increase in membrane permeability (30, 303, 327, 328). For *E. coli* in liquid media, Guyot *et al.* (2010) demonstrated

the importance of structure, fluidity, and permeability maintenance of membrane during heat treatment(310). Moreover, Chang *et al*. (2009) presented electron micrograph analysis showing that heat shock treatment caused damage and disruption in *C. sakazakii* cells, notably in outer membrane (248). In our case, it is also possible to assume that this increased permeability after heat treatment is a worsening of drying impact on membrane integrity. Depending on the duration and severity of the heat stress, the accumulation of defective proteins can result in the bacteria cell inactivation. Importantly, it was already shown that liquid heating promotes protein denaturation and/or aggregation (246). Hence, the alteration of biomolecules can be explaining the major part of the bacterial inactivation during heat treatment in dried state.

The unexplained percentage of uncultivable cells, maximum 53.5%, could be attributed to other alterations occurring in bacterial cells. For example, it could be due to the alteration of some vital biomolecules more sensitive to heat than the two models studied here. Also, it is well known that ribosomal denaturation is another cause of bacterial inactivation during heating and preventing the *de novo* protein synthesis during bacterial recovery (329, 330).

2.7. Conclusion

This study analyzed and compared damages to cellular components, leading to death during drying and successive heat treatment in dried state for three foodborne pathogens in milk powder at two different water activities and two heating temperatures. Results showed that membrane permeability is more implicated in bacterial inactivation (between 20% and 40%) during drying than the loss of enzymatic activity is mainly implicated and clearly showed that loss of enzymatic activity in bacterial inactivation (between 70% and 80%) during heat treatment in dried state. All these results permit to propose different main death causes during these two types of process commonly found in food industry, notably during heat treatment where the major death cause appears to be different in dried state (enzyme or protein) from liquid state (membrane). A better understanding of these phenomena and the role of water activity and temperature would certainly permit to optimize food process to insure food safety by fixing the most deleterious conditions for bacterial cells during both treatments. For example, a time-temperature scale seems to be well adapted for bacterial inactivation by heat treatment while the death induced by drying seems to be linked to an a_W level, corresponding to membrane damage occurrence. Nevertheless, results concern only some foodborne pathogens in milk powder and the conclusion has to be extended by further works on others species and substrates. Also, some other works could be done to determine optimal conditions for other foodborne pathogens.

2.8. Acknowledgement

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (France) and Novolyze (France), which are gratefully acknowledged.

3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, des traitements thermiques ont été effectués sur de la poudre de lait inoculée avec les pathogènes étudiés. Il a ainsi été possible d'observer leurs effets sur la membrane et l'activité respiratoire des bactéries en lien avec la perte de cultivabilité ou l'inactivation de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Senftenberg et *Cronobacter sakazakii*. Nos résultats ont montré que la perte de cultivabilité est liée à une augmentation de la perméabilité de la membrane et à une diminution de l'activité enzymatique. Néanmoins, après traitement thermique, l'inactivation bactérienne est majoritairement liée à la perte d'activité respiratoire. L'ensemble des observations réalisées dans ce chapitre nous ont permis de mieux comprendre les causes de l'inactivation bactérienne pendant les procédés étudiés. Ces résultats pourraient permettre d'optimiser les procédés de séchage et de décontamination thermique. Par exemple, un couple temps-température semble être bien adapté pour l'inactivation bactérienne par traitement thermique, qui concerne essentiellement la dénaturation des protéines alors que la mort induite par séchage pourrait être lié à un niveau d'a_W seuil, correspondant par exemple à un changement de phase membranaire. Pour que ce travail soit complet, il nous a paru indispensable de s'intéresser dans une dernière partie à l'impact du séchage et du traitement thermique sur la virulence des bactéries pathogènes (Chapitre 5).

Chapitre 5

Impact du Séchage et du Traitement Thermique sur la Virulence des Pathogènes Etudiés

1. Introduction

Les bactéries que l'on retrouve dans les produits alimentaires rencontrent de nombreuses contraintes environnementales, comme le séchage ou le traitement thermique, dans les chaines de production.

Lors d'un séchage, les bactéries mettent en place plusieurs mécanismes actifs de résistance, c'est la réponse active au stress (102). Cette réponse active va engendrer l'activation de plusieurs voies métaboliques, comme la réponse à un autre stress ou encore en activant des voies métaboliques impliquées dans la virulence de la bactérie. Par exemple, le système à deux composants PhoQ-PhoP qui détecte un stress acide est connu pour augmenter les propriétés de virulence de *Salmonella enterica* (14). De même, Ye et al. (2015) ont montré que le système à deux composants EnvZ-OmpR est plus présent chez une souche sauvage de *C. sakazakii* que chez une souche dont la virulence est atténuée, ce qui suggère que les changements osmotiques sont également en lien avec la virulence chez cette espèce bactérienne (209). Par conséquent, le fait de sécher un produit alimentaire pourrait avoir un impact sur la virulence bactérienne.

En outre, une fois à l'état sec, un traitement de décontamination peut être appliqué au produit alimentaire, afin d'assurer la sécurité alimentaire. Comme le séchage augmente la résistance des bactéries, il est important de voir si le traitement thermique impacte également les propriétés de virulence des bactéries. Cette notion peut être de première importance en ce qui concerne les nourrissons alimentés avec du lait en poudre ou des préparations à base de lait en poudre. Dans ce chapitre, nous décrivons l'impact du séchage et de traitements thermiques successifs sur la virulence des pathogènes étudiés dans le lait.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- Comprendre l'impact du séchage sur la virulence des pathogènes alimentaires
- Comprendre l'impact du traitement thermique sur la sélection des bactéries déjà résistantes au séchage

Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique en préparation : LANG, E., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P. (2016). **Virulence of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* in milk powder exposed to drying and successive heat treatment**

2. Virulence of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* in milk powder exposed to drying and successive heat treatment

LANG, E., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., PERRIER-CORNET, J.M. AND GERVAIS, P.

2.1. Abstract

Due to the ability of foodborne pathogens to survive in low moisture food, the decontamination of milk powder is an important issue in food protection. Nevertheless, the safety of food products is not always insuring and the different part of food processing involve physiological and metabolically changes. Among these changes, virulence properties can also be affected. In this study, the effect of drying and successive thermal treatments on the invasion capacity of *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Senftenberg, and *Cronobacter sakazakii* was assessed. Bacteria were dried on milk powder at two different water activities (0.25 and 0.58) and heated at two different temperatures (90°C and 100°C) during 30 s and 120 s. After recovery, stressed bacterial populations were put on contact with Caco-2 cells to estimate an invasion capacity. Our results showed that drying increase the invasion capacity of foodborne pathogens but that heat treatment in dried state did not exert a selective pressure on bacterial cells depending on their virulence properties after drying. This entire information permits to increase our knowledge on food safety on dried food product and step back from food processing.

2.2. Keywords

Salmonella enterica, *Cronobacter sakazakii*, Caco-2, invasion, stress

2.3. Introduction

Salmonella enterica is a Gram-negative, facultative anaerobic, motile and non-spore forming bacteria which causes human salmonellosis. It is a major pathogen in food industry and is highly represented in outbreak across the world, with near 100,000 cases every year in European Union (8). Its target population is principally composed of infant and young children (0 - 4 years old). Salmonellosis generally causes nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea (sometimes necrotizing), fever, and headache (89). Due to its low infective dose (1 to 10 cells) to cause illness in infants and immunocompromised populations, *Salmonella* is an important issue for food safety. In parallel, *Cronobacter* (formerly *Enterobacter sakazakii*), another Gram-negative, facultative anaerobic, motile and non-spore forming bacteria, is considered as an opportunistic pathogen which can cause severe infections with a death rate up to 80%, such as meningitis, bacteremia or necrotizing enterocolitis in infants (331). Nevertheless, the infective dose is not

well defined and the incidence of this bacterium is largely underestimated. *Cronobacter* is also a great issue for infant formula industries. Consequently, these two bacteria could be responsive for severe infection after consumption of food product, especially powdered infant formula.

This is the reason why the *Codex Alimentarius*, regulating the food standards, imposes an absence of *Cronobacter* and *Salmonella* contamination in powdered infant formula, formula for special medical purposes and human milk fortifiers (75). Nevertheless, the contamination can escape to the food safety analysis (74, 332). In recent years, some cases have been identified involving infant formula or milk powder for these two pathogens. However, milk contaminations can occur during the transfer to spray-drying and during dried milk handling. This is reflected by some outbreaks involving *Cronobacter*, such as in 1986 in Iceland with 3 cases, in 1988 in USA with 4 cases, in 1998 in Belgium with 12 cases, in 2001 in USA with 11 cases, in 2004 in France with 3 cases or in 2008 in USA with 2 cases, and *Salmonella enterica*, such as in 1976 in Trinidad with 3,000 cases, in 1986 in UK with 76 cases, in 2005 in France with 141 cases or in 2008 in Spain with 42 cases, due to PIF or milk powder (8, 74, 234).

Foodborne bacteria encounter many stresses in food processing environments and food products (15). Drying is one of them and takes place during low moisture food production or during surface contamination. It consists in a diminution of environmental water activity (a_w) which represents the water available for chemical and biochemical reactions. In dried state, bacteria are more resistant to decontamination processes usually used, like heat treatment (14, 21, 333). This is partly due to the stress response induction by activation of metabolic pathways permitting to modify membrane composition and/or protein productions (151).

Stress perception also plays a game in other metabolic pathways, such as activation of some virulence genes governed by several two-component systems which sense environmental perturbations (102). For example, PhoQ-PhoP permits to sense acid stress which is known to increase virulence properties of *Salmonella enterica*. Also, EnvZ-OmpR, implied in osmotic change sensing, could control RNAm and protein regulating HilA, central transcriptional activator in *S. enterica* (14). Likewise, Ye *et al*. (2015) suggest that osmotic changes is also in link with the virulence of *C. sakazakii* through the direct observation that a virulence strain of this bacteria present an higher expression and presence of EnvZ-OmpR than an attenuated strain (209).

Consequently, the fact to transform food can be stressful for foodborne pathogens and may impact bacterial virulence (334). Moreover, once in dried state, a decontamination treatment can be applied to dried food product in order to ensure the food safety. Like drying increase resistance to further decontamination treatment, it is possible to consider that the virulence increase may impact the survival to the heat treat treatment. This notion can be of the primary

importance regarding infants and especially when they are fed with powdered infant formula which can contain foodborne pathogens.

In this study, we describe the impact of drying and successive heat treatment on virulence of *C. sakazakii*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and serovar Senftenberg. All experiments were performed in food product dried at two different a_W levels (0.25 and 0.58) and heating in dried state at two different temperatures (90°C and 100°C). Then, the invasion and multiplication capacity were performed in Caco-2 cells.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Strains cultivations

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 DSM 10506, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Senftenberg 775W DSM 10062 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T strains were used for this study. All cultures were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich) at -80°C. For recovery, bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich) at 37°C for 24 h, subsequently five colonies of each bacterium were picked up in 50 mL of Tryptic Soya Broth (TSB, Sigma-Aldrich) and incubated for 8 h at 37°C. Suspensions were then diluted in 50 mL of new TSB in order to reach an Optical Density (OD) of 0.01 at 600 nm. Cultures in stationary phase were obtained after 20 h at 37 °C.

2.4.2. Inoculation of milk powder

To obtain an inoculated milk powder (26% fat, Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France), 50 mL cultures were centrifuged (3,400 g, 10 min at 25°C) and washed twice with 25 mL of PBS. In a final step, supernatant was removed and cell pellets were weighed. Milk powder was added to pellet with a 1:20 ratio (w_{pellet}:w_{powder}) and homogenized through a mortar. The cultivability of bacteria was estimated by spread plating method after incubation in TSA media for 24 h at 37°C and recorded as CFU/mL.

2.4.3. Drying process

To dry inoculated milk powder, hermetic boxes were used, with saturated salt solutions at the bottom which regulated the a_W and by consequence the atmosphere RH. Potassium acetate and sodium bromide (both from Sigma-Aldrich) was used in this study to reach an a_w of 0.25 and 0.58. Atmospheres were maintained under convection using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) as described in previous work (276). For each strain, inoculated milk powder was spread on four small Petri dishes, with near 2 g per Petri dish, and was placed without the lid inside hermetic boxes for 16 h in order to reach the final a_W level. All drying were performed at

room temperature. The cultivability of bacteria was estimated by spread plating method after incubation in TSA media for 24 h at 37°C and recorded as CFU/mL. The loss of cultivability was also expressed in logarithmic reduction as $\log_{10}(N_1/N_0)$, where N_1 represents the dried bacterial cell concentration and N_0 represents the initial bacterial cell concentration.

2.4.4. Thermal treatments

0.1 g of dried inoculated milk powder were put into 0.2 mL tube and treated at two different holding temperature (90°C and 100°C) for 0 s, 30 s, and 120 s through a thermocycler (Bioer, France). Samples were then cooled at 4°C to stop the impact of thermal treatment. Milk powder was rehydrated by addition of 1 mL of PBS and agitation for 30 s. The cultivability of bacteria was estimated by spread plating method after incubation in TSA media for 24 h at 37°C and recorded as CFU/mL. The loss of cultivability was also expressed in logarithmic reduction as $\log_{10}(N_2/N_1)$, where N_2 represents the final bacterial cell concentration and N_1 represents the dried bacterial cell concentration.

2.4.5. Virulence assays

2.4.5.1. Caco-2 cells maintenance and preparation

Caco-2 ACC 169 (DSMZ, Germany) was used in this study. Cells were maintained in flask of 175 cm^2 in a complete medium, comprising Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen, France), 1% Minimal Essential Medium with Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA 100X, Invitrogen, France), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, France) and 100 µg/mL gentamicin (Invitrogen, France). Flasks were maintained in humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C. At confluence, complete medium was removed and cells were washed triple in PBS (pH 7.2, Invitrogen, France). 5 mL of 0.25% Trypsin-phenol red (Invitrogen, France) was added to cover the cell layers and flasks were incubated 15 min in humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C, permitting to land Caco-2 cells. Action of trypsin was stopped by addition of 20 mL of complete media. Viable cell concentration was estimated through trypan blue (Invitrogen, France). Caco-2 cells were seeded at a density of approximatively 300,000 cells per well in 6-well tissue culture plates (Nunc, France), containing 3 mL of complete medium per well. Plates were incubated in humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C for 15 to 17 days to obtain a full differentiated cell layers. During this period, medium was changed every two days. Before use for virulence assays, cell layers were washed triple in PBS (pH 7.2) and 3 mL of complete medium without gentamicin were added.

2.4.5.2. Bacterial samples preparation

Control, dried and heated bacterial samples were washed in PBS by centrifugation (3,200 g, 5 min, 25°C). If necessary, several samples (arising from the same inoculated milk powder) of a same conditions were pooled together to reach the fixed bacterial concentration for experiment. Counting by CFU were performed after incubation in TSA media for 24 h at 37°C and results were expressed as $\log_{10}(N/N_0)$, where N represented the CFU after thermal treatment and N_0 represented the initial contamination of drying inoculated milk powder. Bacterial concentration of each sample was adjusted at 10^7 CFU/mL.

2.4.5.3. Invasion and multiplication in Caco-2 cells

10 µL per well of prepared bacterial sample were added. Following incubation in humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C for 1 h 30, 30 µL of 10 mg/L gentamicin (concentration per well of 100 µg/mL) were added before incubated in humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C for 30 min. Then, medium was removed and each well was washed triple with PBS (pH 7.2). Caco-2 cells were lysed with 1% Triton X-100 for 5 min. The cell lysates were then diluted and plated in TSA Petri dishes and incubated at 37°C for 24 h, permitting to estimate the CFU.

2.4.6. Statistical analyses

All experiments were performed 5 times independently. The effects of the factors on the thermal treatment were evaluated for each bacterium by analysis of variance (ANOVA) using R software (278). Significance was evaluated when p-value was equal or under 0.05; in this case a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions.

2.5. Results and discussion

In our study, we present the effect of drying and heating in dried state on the invasion in Caco-2 cells capacity of *C. sakazakii*, *S.* Typhimurium and *S.* Senftenberg.

2.5.1. Impact of drying on cultivability and bacterial virulence

The effect of drying on the invasion capacity of studied foodborne pathogens was presented in **Figure 42**. ANOVA test revealed a significant effect of water activity level of the decimal logarithm of bacterial population found after invasion test. For *C. sakazakii* (Figure 1a), HSD test revealed two groups significantly different. The first one is represented by the pure culture, with 3.9 log bacteria ("Control" on Figure **42 (a)**) after the invasion test. The second one is compound of the three different drying levels (i.e. 0.80, 0.58 and 0.25). The difference between the both

HSD groups represent about 0.52 log. For *S.* Typhimurium (**Figure 42 (b)**), HSD test revealed two groups significantly different. The first one is represented by the pure culture, with 3.8 log bacteria ("Control" on **Figure 42 (b)**) after the invasion test. The second one is compound of the three different drying levels. The difference between the both HSD groups represent about 0.54 log. For *S.* Senftenberg (**Figure 42 (c)**), HSD test revealed two groups significantly different. The first one is represented by the pure culture and drying at 0.8 a_W level, with 3.9 and 4.0 log bacteria ("Control" on **Figure 42 (c)**) after the invasion test. The second one is composed of the three different drying levels. The difference between both HSD groups represent about 0.20 log. No difference was observed among the different drying level. The drying level of $a_W = 0.80$ belonged to both groups.

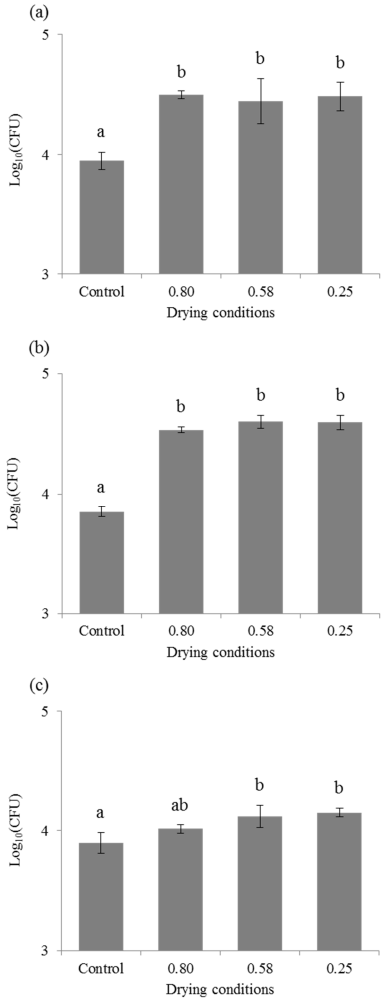

Figure 42 : Impact of drying on the invasion in Caco-2 cells of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. Results of invasion after 1 h 30 are presented in log10(CFU) for a same inoculum of (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. "Control" represents the invasion of pure culture, "0.80" is directly after the inoculation of milk powder, "0.58" is directly after the drying until an a_W of 0.58 and "0.25" is directly after the drying until an a_W of 0.25. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates. Letters above bars represent the significant differences among conditions resulting of Tukey's HSD test.

These foodborne pathogens were commonly involved in outbreaks incriminating milk powder. By consequence, the drying represents the first stress encountered in the food processing of milk, hence its importance on virulence properties. Many stresses are known to impact the virulence capacity of foodborne pathogens, especially for *S. enterica* which is well studied. The most stress studied is the acid stress, for which bacteria can adapt, and demonstrate to increase invasion properties of bacterial cells (14, 335, 336). The acid stress response is under the control of RpoS, general stress response transcriptional factor (14, 206). This transcriptional factor is also implicated in host colonization by activating several genes involved in virulence process, such as the *spv* virulence plasmid regulation gene (206, 311, 337). Moreover, RpoS is also known to play a role in other stress response, such as osmotic stress by activating the accumulation of ions and compatible solutes through *proU* activation (14, 151, 338–340). By consequence, osmotic stress could also activate such virulence properties. Also, during desiccation, an activation of RpoE regulon is also known and this impact the virulence property of *S. enterica* for which RpoE transcriptional factor is essential to succeed inside the host (126). Nevertheless, these mechanisms are active and involve metabolic activity to be proceeded. This is notably confirmed by results obtained in this study which showed that virulence was increased until 0.80 but not between 0.80 and the final a_W level. Indeed, physiological water activities were between 0.99 and 0.93 or 0.99 and 0.94 for *S. enterica* and *C. sakazakii*, respectively, permitting an increase of invasion capacity in this water activity range. Even if several studies look at the impact of osmotic stress in liquid media (i.e. water/glycerol or salt solution), few of them are especially focus on desiccation.

The loss of cultivability after drying at an a_W of 0.25 and 0.58 were represented in **Figure 43**.

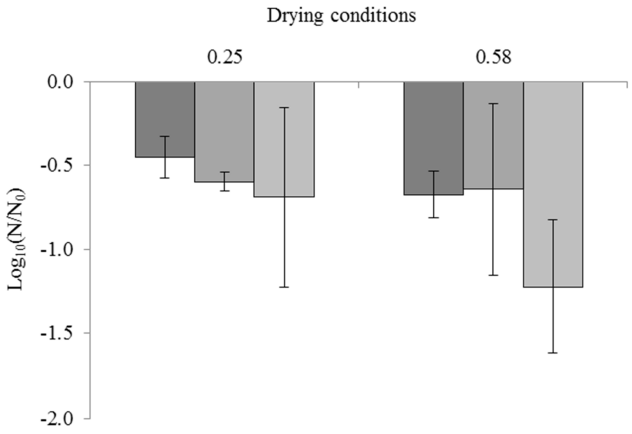

Figure 43 : Impact of drying on the cultivability of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. From darker to lighter, the results are presented for (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates.

For *S.* Typhimurium and *C. sakazakii*, the loss of cultivability was compensated by the virulence increase. Indeed, for *C. sakazakii*, the loss of cultivability represented – 0.45 log and – 0.68 log after drying at an a_W of 0.25 and 0.58, respectively, while the virulence increase was represented by an invasion increase of 0.52 log in both case. In the same way, regarding *S.* Typhimurium, at water activity of 0.25 and 0.58, the uncultivable bacteria represented – 0.60 log and – 0.65 log of initial bacteria, respectively, while the virulence increase represented 0.54 log of invasive bacteria. Nevertheless, the virulence increase did compensate the loss of cultivability for *S.* Senftenberg, for which the loss of cultivability is about – 0.69 log and – 1.22 log after drying at an a_W of 0.25 and 0.58, respectively. By consequence, the resistance could impact the disease-causing potential of bacterial of *C. sakazakii* and *S.* Typhimurium. Thus, the ability to deal successfully with drying could help bacterial virulence. Finally, it is necessary to step back that drying have a potential negative impact on food safety. Its conditions have to be managed to insure a minimal activation of several metabolic pathways which could be involved in virulence increase.

2.5.2. Impact of heating in dried state on cultivability and virulent bacteria

Impact of heat treatment on bacterial cultivability was presented in **Figure 44**. ANOVA test revealed significant effect of temperature, time and strains on the bacterial inactivation. For each bacterium, the loss of cultivability was more important for an a_W of 0.58. In the same way, it was more important for high temperature (100°C) and long treatment time (120 s). For each bacterium, the lowest loss of cultivability were observed for a milk powder at an a_W of 0.25 treated at 90°C for 30 s. After 120 s at 100°C on a milk powder at 0.58, cultivability of both *Salmonella* serovars were under the detection limit of the method (see **Figure 44**).

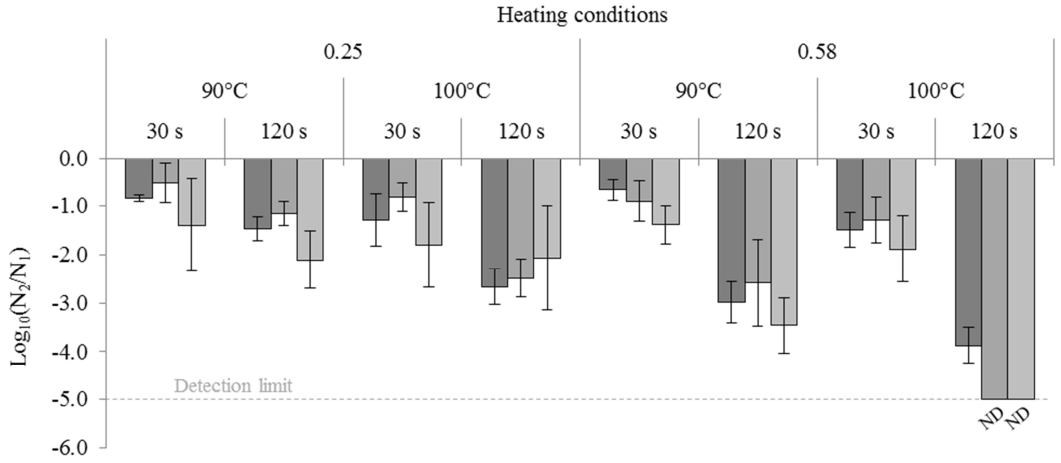

Figure 44 : Impact of heating on the cultivability of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. From darker to lighter, the results are presented for (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates.

The effect of heating in dried state on the invasion capacity of studied foodborne pathogens was presented in **Figure 45**. For each bacterium, ANOVA test revealed no significant effect of heating conditions compared to drying ("0 s" in **Figure 45**) on bacteria after invasion test. Dried food products were heated to insure food safety; nevertheless microorganisms are more resistant to decontamination process in dried state than in liquid media. This is partially due to the low water activity which stabilize physiological structure and also due to the cross protection mechanisms.

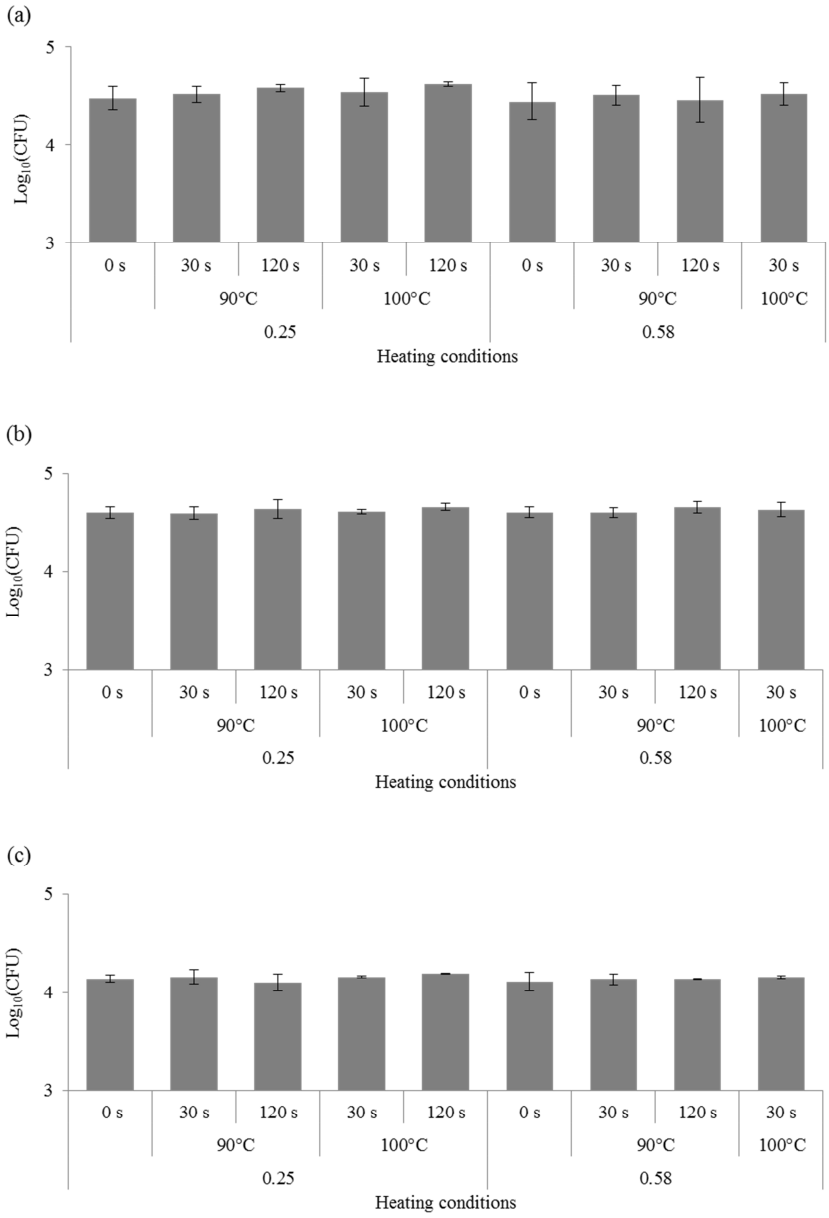

Figure 45 : Impact of heating in dried state on the invasion and multiplication in Caco-2 cells of *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg. Results of invasion after 1 h 30 are presented in $\log_{10}$(CFU) for a same inoculum of (a) *Cronobacter sakazakii*, (b) *Salmonella* Typhimurium and (c) *Salmonella* Senftenberg. Error bars represent the standard deviation calculated on independent triplicates. Letters above bars represent the significant differences among conditions resulting of Tukey's HSD test.

Notably, the osmotic stress permit to synthetize HSP proteins (Heat Shock Proteins) permitting to protect proteins and membrane from alteration due to the heat. The fact that during drying some mechanisms can be engage by bacteria permit also to think that the synthetized protein or structure an impact on heat resistance and positively or negatively impact resistance to heat treatment. Indeed, virulence mechanisms involve synthetize of several protein and factor which modify the membrane or cytosol composition which could influence the stress resistance. For example, some virulence proteins are membrane proteins and a modification of membrane composition could impact on the transition phase (93, 173). Consequently, this could impact resistance. In our case, no difference was detected between heated bacteria and dried bacteria, suggesting that activation of virulence during drying do not interfere with heat sensitivity.

2.6. Conclusion

This study analyzed the impact of stress during drying and successive heat treatment for three foodborne pathogens in milk powder. Our results showed that drying until 0.80 significantly increased virulence properties of these bacteria. Further drying and following heat treatments did not modify virulence properties of the three studied bacteria. All these results permit to stand back from food processing and to better understand its impact on health regarding the dried food products. Indeed, even if impact of several stress on virulence has already been shown, this is the first record of the impact of drying in aerial way on invasion capacity of *Salmonella enterica* and *Cronobacter sakazakii*.

2.7. Acknowledgement

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (France) and Novolyze (France), which are gratefully acknowledged

3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'impact du séchage et du traitement thermique sur la virulence des bactéries a été étudié. Il a été possible de montrer que le séchage augmente les propriétés d'invasion des bactéries grâce à des mécanismes actifs au début du séchage (jusqu'à une activité de l'eau de 0,8). Par contre, les propriétés d'invasion des bactéries n'augmentent pas lors d'un séchage d'une activité de l'eau de 0,8 à une activité de l'eau de 0,58 ou 0,25. Le pouvoir invasif d'une population est lié au nombre de bactéries et à leur capacité à se rependre dans les tissus. Il ressort de nos résultats que le pouvoir invasif d'une population séchée (comprenant des bactéries mortes et des bactéries survivantes) jusqu'à une activité de l'eau de 0,8 est le même que la population initiale (comprenant uniquement des bactéries vivantes), c'est-à-dire que la population de bactéries séchées, présentant un nombre de bactéries cultivables moins important, a un pouvoir invasif équivalent à la population de bactéries non stressées, possédant un nombre de bactéries cultivables plus important . En effet, dans ce cas, la perte de population est compensée par l'augmentation de la virulence. Lors d'un traitement thermique à l'état sec, aucune évolution de la capacité d'invasion par rapport à l'état sec n'a été détectée. De plus, l'augmentation de la virulence lors du séchage ne permet plus de compenser la perte de cultivabilité induite par le traitement thermique. L'ensemble de ces résultats permet de prendre du recul vis-à-vis des opérations de production des produits secs et conforte l'idée que le séchage doit être bien maitrisé. De même, le traitement thermique doit être optimisé et contrôlé dans le but d'éliminer au maximum la flore pathogène, surtout dans les produits destinés à une population sensible.

Discussion Générale

Les impacts du séchage, de la réhydratation et du traitement thermique ont été étudiés sur deux espèces pathogènes dans le but de contribuer à rationaliser la décontamination thermique de produits secs, notamment à travers la compréhension du rôle spécifique de l'activité de l'eau dans les milieux considérés. Cette étude a permis d'établir un modèle prédictif et de définir des traceurs biologiques potentiels pour les pathogènes étudiés. Ces travaux ont également permis d'apporter des réponses aux interrogations qui sont ressorties de l'étude bibliographique qui peuvent se résumer sous trois questions, à savoir :

- Quel est l'impact du séchage sur les bactéries pathogènes ?
- Quel est l'impact de la réhydratation sur les bactéries pathogènes ?
- Quel est l'impact du traitement thermique à l'état sec sur les bactéries pathogènes et pouvons-nous le prédire ?

Les réponses sont successivement présentées dans cette discussion et illustrées par des schémas représentant les observations et hypothèses proposées.

Quel est l'impact du séchage sur les bactéries pathogènes ?

Lors de la mise en place des travaux, il était évident qu'avant de pouvoir proposer un traitement thermique sur des produits secs, il fallait sécher les pathogènes et assurer un maximum de survie pendant le séchage. En effet, si nous ne pouvions pas sécher les bactéries en conservant un maximum de cultivabilité, il n'aurait pas été possible d'obtenir un suivi significatif de la diminution logarithmique de bactéries sèches pendant le traitement thermique. De plus, les bactéries Gram-négatives étant sensibles aux fluctuations hydriques, il était donc clair que cette étape allait être charnière pour la suite des travaux. En effet, lors des premiers tests, la perte de cultivabilité des bactéries pendant le séchage était conséquente. De ce fait, nous nous sommes donc intéressés plus en détail à cette étape avec deux objectifs distincts : le premier étant de maximiser la perte de cultivabilité pour envisager le séchage comme une étape supplémentaire de décontamination et le second étant de conserver un maximum de cultivabilité pour pouvoir réaliser par la suite nos analyses en traitement thermique.

L'impact du séchage a été étudié sur les trois bactéries pathogènes ciblées : *Salmonella enterica* sérotypes Typhimurium et Senftenberg ainsi que *Cronobacter sakazakii*. Les conditions de séchage ont été choisies pour correspondre aux valeurs trouvées pour les produits alimentaires secs, c'est-à-dire des activités de l'eau inferieures à 0,60 (6, 33), notamment à celle du lait en poudre (0,25 - 0,45) (8, 74).

Globalement, il ressort de l'ensemble de ces travaux que :

- Pour optimiser l'inactivation des pathogènes au cours du séchage, il faut : (i) utiliser des cinétiques initiales intermédiaires et (ii) atteindre un niveau faible d'activité de l'eau

- Le séchage engendre, de façon majoritaire, une augmentation de la perméabilité membranaire et, de façon minoritaire, une perte d'activité enzymatique
- Le séchage engendre une augmentation de la virulence
- Le substrat est de première importance

Plus précisément, pendant le séchage, la première diminution de l'a_W est engendrée par l'évaporation de l'eau ce qui provoque une concentration des solutés dans le milieu extracellulaire et donc une augmentation de la pression osmotique. Par conséquent, un mouvement d'eau de la cellule vers le milieu extérieur se produit (**Figure 46**) (100). Ce phénomène engendre un stress osmotique qui, même si les bactéries possèdent des mécanismes d'acclimatation, conduit à des dommages affectant les macromolécules et les membranes (100, 276, 279). Ces modifications peuvent être irréversibles, comme la perte de membrane sous forme de vésicules, et peuvent diminuer la cultivabilité des bactéries (**Figure 46 (a) et (b)**). Cependant, elles peuvent aussi être réversibles et nécessiter des mécanismes de réparation avant que les cellules puissent se développer (280, 281). Ceci explique le temps de reprise de croissance supplémentaire observé après séchage dans notre étude. Lors de l'acclimatation des bactéries, les mécanismes de réponses aux stress peuvent impacter d'autres voies métaboliques comme celles impliquées dans l'expression de la virulence, tel que nous l'avons observé. RpoS est connu pour jouer un rôle dans la réponse au stress osmotique (105, 341). Ce facteur de transcription est également impliqué dans la colonisation de l'hôte en activant plusieurs gènes impliqués dans le processus de virulence chez *S. enterica*. En conséquence, le stress osmotique peut donc activer certaines propriétés de virulence. De même, au cours du séchage, une activation du régulon de RpoE a déjà été décrite, sachant que RpoE est essentiel pour la virulence de *S. enterica*.

Après cette première phase de déshydratation en milieu liquide, les cellules bactériennes sont exposées à l'oxygène de l'atmosphère, ce qui génère des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules et l'accumulation de radicaux libres (19, 100). Plusieurs études en milieu liquide ont montré que la mort cellulaire pendant une déshydratation est corrélée à la perméabilisation de la membrane, notamment pour *Saccharomyces cerevisiae* et *E. coli* (142, 146, 283, 284). Cependant, peu d'études ont été effectuées en milieu sec. Il semble que le séchage perturbe l'intégrité de la membrane bactérienne et dans une moindre mesure les protéines (276). La dénaturation des protéines peut également affecter l'intégrité de la membrane plasmique, qui comprend des protéines et des lipides (276).

Nos résultats montrent que le séchage dans le lait est favorable à la survie bactérienne en comparant avec le séchage effectué dans le PBS, ce qui peut être expliqué par la composition du lait (109, 287). En effet, les concentrations élevées en disaccharides sont connues et utilisées

pour la protection et la conservation de microorganismes secs (288). Le lait comprend en outre des protéines et des phospholipides qui peuvent fournir des cibles alternatives à l'oxydation. Considérant l'effet du lait observé ici, nous suggérons que le substrat de séchage, et plus précisément le couple pathogène-substrat, est un paramètre majeur à prendre en compte pour comprendre la perte de cultivabilité des pathogènes pendant le séchage.

De façon originale, nous avons constaté qu'en sélectionnant les conditions de séchage, il est possible d'envisager le séchage comme une étape supplémentaire de décontamination des produits secs, en séchant à des vitesses spécifiques (entre $-25{,}2 \times 10^{-4}$ et $-11{,}2 \times 10^{-4}$ unité d'a_W par minute) et jusqu'à de faibles niveaux d'a_W (inférieure à 0,25). Des conclusions inverses peuvent être tirées vis-à-vis de la préservation de la cultivabilité de microorganismes d'intérêt après séchage. De plus, au vu de l'effet du séchage sur la virulence, il parait essentiel de bien maitriser les conditions de séchage pour éviter l'activation de la virulence chez les pathogènes alimentaires. Enfin, tous les résultats concernant le séchage ont été obtenus nécessairement après une étape de réhydratation. Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'influence de la cinétique de réhydratation sur la cultivabilité.

Quel est l'impact de l'étape de réhydratation sur les bactéries pathogènes ?

Comme les produits secs nécessitent une étape de réhydratation pour leur analyse et/ou leur utilisation, l'influence de cette étape sur la perte de cultivabilité *Salmonella enterica* sérotypes Typhimurium et Senftenberg ainsi que *Cronobacter sakazakii* a été étudiée (**Figure 46**).

- Il ressort clairement de nos résultats que l'inactivation bactérienne est la somme de l'inactivation due au séchage seul (déshydratation) et de l'inactivation due à la réhydratation.

De manière originale, il apparait donc que la réhydratation et plus exactement sa cinétique joue un rôle important dans l'inactivation bactérienne des pathogènes alimentaires des produits secs. L'impact de la réhydratation après un stress hydrique a déjà été mis en lumière pour d'autres microorganismes, comme les bactéries Gram-positives (147, 149, 293) et les levures (146, 148). Cependant, ces microorganismes étant différents et les stress hydriques étant souvent réalisés dans des milieux liquides à faibles activités de l'eau, comme de l'eau glycérolée, il était essentiel d'observer l'impact de la réhydratation sur des bactéries Gram-négatives séchées en milieu aérien.

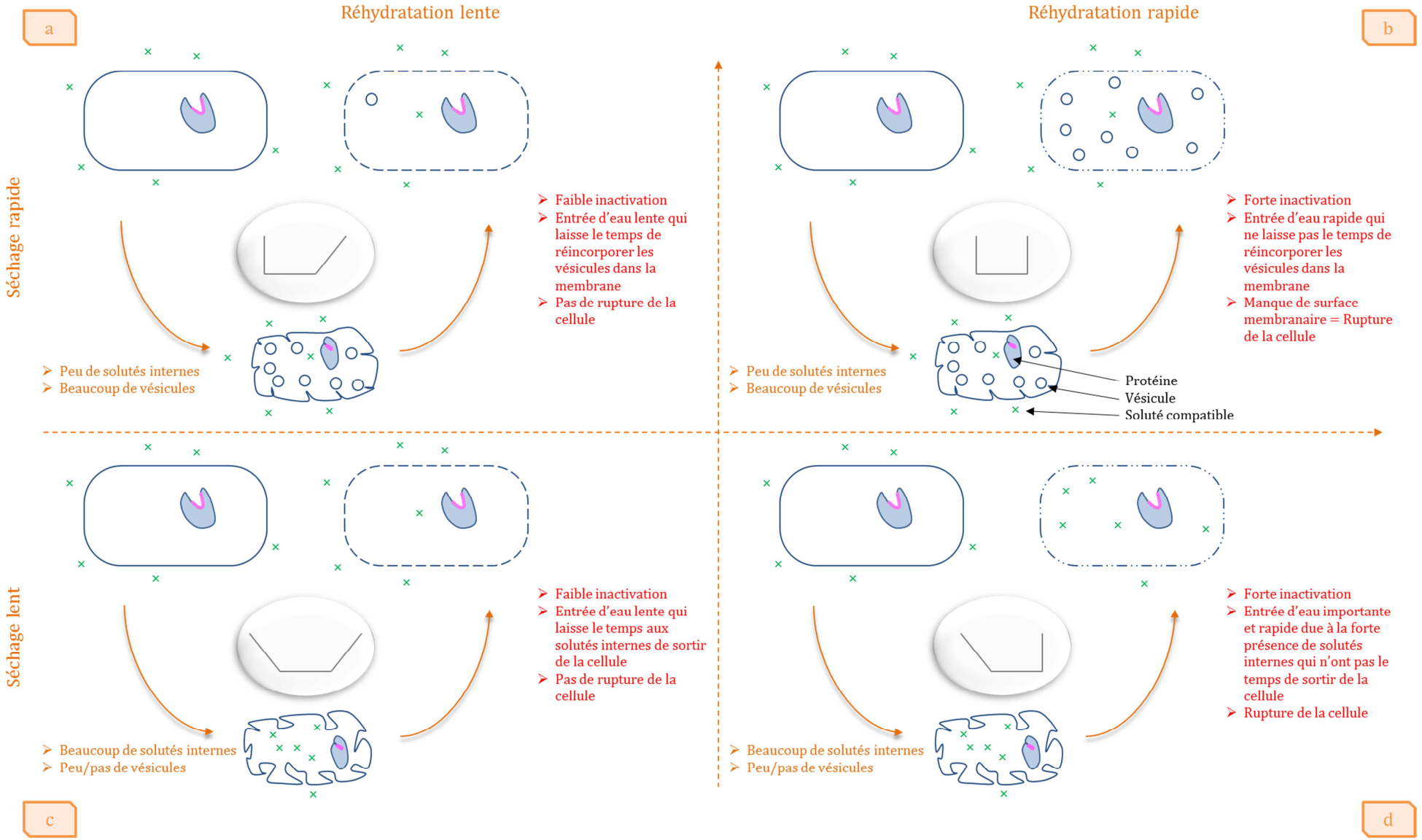

Figure 46 : Effet de du séchage et de la réhydratation sur les bactéries Gram-négatives, schéma de résultats et d'hypothèses .

Il ressort de nos résultats que plus la réhydratation est lente plus l'inactivation bactérienne est faible et donc plus la perte de cultivabilité des bactéries due au séchage est faible. Cet effet de la réhydratation peut être attribué à deux phénomènes, représentés schématiquement **Figure 46**. Le premier est dû à la formation de replis membranaires puis de vésicules qui peuvent être produits pendant la phase de déshydratation rapide, ce qui réduit la surface membranaire (**Figure 46 (a) et (b)**) (101, 142, 146). Lors d'une réhydratation successive très rapide, l'eau va rentrer brusquement dans la cellule mais, la surface membranaire disponible étant réduite, une rupture membranaire se produit (**Figure 46 (b)**) (295). A l'opposé, pendant une réhydratation très lente, l'augmentation lente du volume cellulaire en lien avec l'entrée progressive de l'eau dans la cellule va laisser le temps aux vésicules d'être réincorporées dans la membrane, prévenant ainsi sa rupture (**Figure 46 (a)**). Le deuxième phénomène qui peut expliquer l'importance de la réhydratation est l'entrée d'ions et de solutés dans la cellule pendant la phase de séchage et plus particulièrement pendant le séchage lent (**Figure 46 (c) et (d)**). En effet, ces ions et solutés compatibles accumulés dans la cellule ressortent moins vite que l'eau ne rentre, lors d'une réhydratation très rapide. De ce fait, osmotiquement, le volume d'eau incorporé à la cellule sera supérieur au volume initial ce qui va provoquer une rupture membranaire (**Figure 46 (d)**).

Il serait intéressant de confirmer les effets induits par la réhydratation sur plusieurs autres produits secs, comme le lait en poudre, et pour plusieurs vitesses de réhydratation afin de pouvoir quantifier son importance et éventuellement, à terme, « normaliser » cette étape, aussi bien pour les analyses de routine que pour l'établissement des consignes destinées aux consommateurs.

Quel est l'impact du traitement thermique à l'état sec sur les bactéries pathogènes et pouvons-nous le prédire ?

L'impact du traitement thermique a été étudié sur les trois bactéries pathogènes ciblées. Les conditions de traitement thermique correspondent à ce qui peut être appliqué en industries agroalimentaires.

Il ressort de cette étude que :

- L'inactivation des bactéries par la chaleur est grandement diminuée avec la diminution de l'activité de l'eau du substrat
- Il en résulte que les traitements thermiques des produits secs doivent être effectués préférentiellement en vase clos afin d'éviter leur séchage

- Un modèle prédictif prenant en compte le temps, la température et l'activité de l'eau est développé
- Des traceurs biologiques ont été proposés comme solution alternative
- La majorité de l'inactivation bactérienne est liée à la perte d'activité enzymatique et donc à des dommages aux macromolécules
- Le traitement thermique n'influence pas la virulence des bactéries par rapport à l'état sec avant traitement

La résistance au traitement thermique est influencée par les propriétés physico-chimiques du produit alimentaire traité, comme par exemple le pH, la concentration en sel, le potentiel d'oxydo-réduction ou l'activité de l'eau. Dans notre cas, nous nous sommes focalisés sur l'activité de l'eau qui est un paramètre important et surtout variable pour les produits dit « secs ». Cela nous a permis de proposer un modèle prédictif prenant en compte le rôle du temps, de la température et de l'activité de l'eau sur l'inactivation bactérienne.

Plus particulièrement, le rôle spécifique de l'activité de l'eau est décrit par un nouveau paramètre, y_{aw}, qui représente l'élévation de l'activité de l'eau nécessaire pour réduire le temps de réduction décimale d'un facteur 5, à une température donnée. De manière générale, les valeurs de temps de réduction décimale données dans la littérature sont bien inferieures dans les milieux aqueux que dans les produits secs (156, 306). De la même manière, dans le cas de notre étude et pour chaque bactérie, le facteur z_T, correspondant à l'élévation de la température nécessaire pour réduire la valeur de réduction décimale par 10, est 10 fois plus élevé qu'en milieu liquide. Cette information confirme l'idée que les faibles activités de l'eau augmentent la résistance thermique des bactéries.

Cette résistance singulière à la chaleur à l'état sec peut être attribuée à deux facteurs principaux. Le premier est la faible mobilité moléculaire consécutive à la faible teneur en eau des produits secs qui prévient les ruptures des liaisons chimiques responsables de la structure fonctionnelle des protéines (274). De plus, cette faible mobilité de l'eau engendre un changement de phase membranaire. En effet, la phase membranaire correspondant à l'activité physiologique est une phase liquide-cristalline. La phase dans laquelle se trouve la bicouche phospholipidique est fortement influencée par des paramètres environnementaux tels que la température ou l'activité réduite d'eau (342). Le changement de l'état liquide à l'état gel lors du séchage pourrait affecter la stabilité de la membrane face à la température (308). Le second facteur est le phénomène actif de protection croisée par l'activation de voies génétiques et métaboliques lors du passage à l'état sec (102, 151). Cette protection croisée est bien connue pour *S. enterica*. En effet, les travaux antérieurs montrent que le séchage implique une synthèse de protéines de choc thermique

protégeant la conformation des protéines en empêchant les dommages sur leur structure et sur leur site actif (107).

Peu d'études se sont intéressées à l'effet du traitement thermique sur les cellules bactériennes dans les produits alimentaires secs. Certaines études ont été effectuées à de faibles activités de l'eau dans des milieux liquides où l'inactivation des cellules a été associée à une augmentation de la perméabilité membranaire (30, 303, 327, 328). Néanmoins, nos résultats montrent que la perméabilité de la membrane est responsable d'une part mineure de la perte de cultivabilité pendant le traitement thermique à l'état sec et que la dénaturation des biomolécules explique la majeure partie de l'inactivation bactérienne pendant le traitement thermique à l'état sec. D'autres causes, comme la dénaturation des ribosomes, peuvent également expliquer la perte de cultivabilité (329).

Tous les traitements thermiques ont été réalisés dans des tubes fermés et, par conséquent, la teneur en eau de l'échantillon est stable au cours du traitement. Cela permet d'éviter le séchage du produit alimentaire lors du traitement thermique. Avec cette constatation, il est possible de promouvoir des procédés de traitements thermiques des produits secs en vase clos. Enfin, il est intéressant d'observer que le traitement thermique n'affecte pas la virulence des bactéries pathogènes survivantes.

Grâce à l'isolement de bactéries environnementales sur des produits secs de l'entreprise partenaire, des bactéries pouvant jouer le rôle de traceurs biologiques ont été proposées. Dans un premier temps, il nous a paru essentiel d'utiliser des isolats employables en industries agroalimentaires, c'est-à-dire non pathogènes pour l'homme. De plus, les tests thermiques effectués à une activité de l'eau de 0,25 et une température de 90°C nous ont permis de vérifier leur rôle de traceurs (par comparaison de profils). De plus, nous avons montré que le traceur régulièrement utilisé, *E. faecium*, n'est pas adapté pour le lait en poudre, car trop résistant. Cela montre la nécessité de valider le traceur dans les conditions réelle du traitement thermique et sur le substrat ciblé.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette étude est d'approfondir la compréhension des mécanismes d'inactivation de bactéries pathogènes dans les produits alimentaires secs afin d'optimiser leur décontamination. Ces produits alimentaires sont fortement incriminés dans les toxi-infections alimentaires collectives, notamment à cause de la forte contamination à *Salmonella enterica*. De plus, dans le cadre de la nutrition infantile, *Cronobacter* spp. est une bactérie dangereuse à cause du fort taux de mortalité des rares cas qu'elle provoque. Ces microorganismes sont donc de première importance pour étudier l'inactivation bactérienne dans les produits alimentaires secs. L'ensemble de ces travaux a permis de répondre à des questions fondamentales mais trouve également des débouchés industriels.

Une partie de ce travail a été consacrée à la compréhension de l'impact du séchage sur des bactéries pathogènes.

- ✓ Du point de vue fondamental, nous avons montré que le séchage est une étape cruciale pour la cultivabilité des pathogènes et que ses conditions sont des facteurs clés. Le séchage sur substrat lait permet notamment une bonne préservation de la cultivabilité bactérienne. L'inactivation bactérienne liée au séchage est fortement corrélée à la perméabilisation de la membrane plasmique des bactéries tandis que les macromolécules sont moins affectées par le séchage. De plus, un séchage modéré (allant jusqu'à une activité de l'eau de 0,80) augmente le pouvoir invasif des bactéries survivantes.
- ✓ D'un point de vue industriel, le séchage a pu être envisagé comme une étape préalable de décontamination. En effet, même si cet effet est substrat dépendant, il a été observé qu'en sélectionnant les conditions de séchage, comme l'a_W finale (à savoir, dans cette étude, une a_W faible) ou encore la cinétique initiale (à savoir, dans cette étude, une vitesse initiale intermédiaire) il est possible de diminuer la cultivabilité des bactéries et la virulence des pathogènes.
- ➢ Pour aller plus loin, ces observations pourraient être étendues à différents types de séchage (atomisation, lit fluidisé, …) pour affiner le choix de leurs conditions. Les essais réalisés dans ces travaux ont été effectués sur deux types de substrats (un milieu salin et du lait) et deux types d'inoculation (en surface et masses). Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude du séchage mais sur d'autres produits alimentaires secs et d'autres contaminants biologiques (virus, bactéries Gram-négatives, etc). De même, le séchage peut également être envisagé comme un moyen de décontamination dans d'autres domaines, comme les surfaces des industries agroalimentaires (objectif de l'ANR EcoSec, voir en annexe) ou encore des hôpitaux.

Une deuxième partie de ce travail a été consacrée à la compréhension de l'impact de la réhydratation sur l'inactivation des pathogènes.

- ✓ D'un point de vue fondamental, nous avons montré que la réhydratation est responsable de la majeure partie de l'inactivation bactérienne pendant un cycle de séchage/réhydratation. Globalement, les cinétiques de réhydratation lentes sont favorables à la survie bactérienne.
- ✓ D'un point de vue pratique, ces résultats peuvent trouver une application rapide dans les analyses de routine car la réhydratation est une étape importante lorsque la cultivabilité des pathogènes secs est évaluée.
- ➢ Pour aller plus loin, ces premières observations pourraient être complétées sur différents types de produits alimentaires secs, mais également sur deux types de contamination (surface et masse). De plus, l'étape de réhydratation doit être standardisée aussi bien pour l'analyse microbiologique de routine que pour la réhydratation des produits secs chez le consommateur.

Une troisième partie de ce travail a été consacrée à la compréhension de l'impact des traitements thermiques sur les bactéries pathogènes.

- ✓ Du point de vue fondamental, cette étude a permis de montrer que l'efficacité du traitement thermique de la poudre de lait dépend grandement des facteurs temps, température et activité de l'eau. Plus l'activité de l'eau est faible, plus la décontamination thermique de la poudre de lait est difficile. Nous avons pu proposer un modèle loglinéaire prenant en compte l'importance de ce facteur. De plus, il est clair que le traitement thermique affecte fortement les macromolécules, de par la forte perte d'activité enzymatique observée dans cette étude. Il affecte également en moindre mesure l'intégrité membranaire.
- ✓ D'un point de vue industriel, les conditions du traitement thermique pourront être fixées ou optimisées à l'aide du modèle proposé. De plus, les traceurs biologiques proposés dans cette étude pourront servir pour la validation de procédés thermiques afin de s'assurer de l'inactivation de *Salmonella enterica*. Par ailleurs et au vu de l'importance de l'activité de l'eau sur l'inactivation des bactéries, il faut impérativement éviter le séchage du produit pendant le traitement thermique, c'est pourquoi des procédés de traitement thermique en vase clos devraient être privilégiés, sachant qu'actuellement beaucoup de produits secs sont traités en continu dans des systèmes ouverts.
- ➢ Pour aller plus loin, le modèle proposé dans cette étude doit être étendu à d'autres pathogènes alimentaires ou encore d'autres produits secs. De plus, il est possible d'envisager de sélectionner d'autres traceurs biologiques avec la méthode établie dans

cette étude. De plus, plutôt que de se tourner vers des traceurs bactériens et étant donné que nous avons constaté que l'inactivation thermiques des bactéries pathogènes étudiées est en lien avec la dénaturation des macromolécules, des traceurs comme des enzymes pourraient également être envisagés.

Finalement, ce travail nous a permis de mieux comprendre l'inactivation des pathogènes pendant les étapes clés de la production de produits alimentaires secs. Cette compréhension a également donné des éléments permettant d'optimiser la destruction des pathogènes alimentaires et peut–être, à terme, de développer de nouveaux procédés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Leguérinel I**, **Spegagne I**, **Couvert O**, **Coroller L**, **Mafart P**. 2007. Quantifying the effects of heating temperature, and combined effects of heating medium pH and recovery medium pH on the heat resistance of *Salmonella* Typhimurium. Int. J. Food Microbiol. **116**:88–95.

2. **Leguerinel I**, **Couvert O**, **Mafart P**. 2000. Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. Int. J. Food Microbiol. **55**:223–227.

3. **Lekogo BM**, **Coroller L**, **Mathot AG**, **Mafart P**, **Leguerinel I**. 2010. Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. Int. J. Food Microbiol. **141**:242–247.

4. **Gurtler JB**, **Doyle MP**, **Kornacki JL**. 2014. The microbiological safety of spices and low-water activity foods: Correcting historic misassumptions, p. 3–13. *In* Gurtler, JB, Doyle, MP, Kornacki, JL (eds.), The microbiological safety of low water activity foods and spices. Springer science+business media, LLC.

5. **Al-Muhtaseb AH**, **McMinn WAM**, **Magee TRA**. 2002. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: A review. Food Bioprod. Process. **80**:118–128.

6. **Syamaladevi RM**, **Tang J**, **Villa-Rojas R**, **Sablani S**, **Carter B**, **Campbell G**. 2016. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: A review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **15**:353–370.

7. **Gould GW**. 2000. Preservation : Past , present and future. Br. Med. Belletin **56**:84–96.

8. **Beuchat LR**, **Komitopoulou E**, **Beckers H**, **Betts RP**, **Bourdichon F**, **Fanning S**, **Joosten HM**, **Ter Kuile BH**. 2013. Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. J. Food Prot. **76**:150–172.

9. **Fitzpatrick JJ**, **Ahrné L**. 2005. Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. Chem. Eng. Process. Process Intensif. **44**:209–214.

10. **Cuq B**, **Rondet E**, **Abecassis J**. 2011. Food powders engineering, between knowhow and science: Constraints, stakes and opportunities. Powder Technol. **208**:244–251.

11. **Santillana Farakos, Sofia M. Frank JF**. 2014. Challenges in the control of foodborne pathogens in low-water activity foods and spices, p. 15–34. *In* Gurtler, JB, Doyle, MP, Kornacki, JL (eds.), The microbiological safety of low water activity foods and spices. Springer science+business media, LLC, London.

12. **Kornacki JL**. 2014. Processing plant investigations: Practical approaches to determining

sources of persistent bacterial strains in the industrial food processing environment, p. 67–83. *In* Gurtler, JB, Doyle, MP, Kornacki, JL (eds.), The microbiological safety of low water activity foods and spices. Springer science+business media, LLC.

13. **Anses**. 2011. Fiche de desciption de danger biologique transmissible par les aliments: *Salmonella* spp .

14. **Rychlik I**, **Barrow PA**. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. FEMS Microbiol. Rev. **29**:1021–1040.

15. **Humphrey T**. 2004. *Salmonella*, stress responses and food safety. Nat. Rev. Microbiol. **2**:504–509.

16. **Martínez JL**. 2013. Bacterial pathogens: From natural ecosystems to human hosts. Environ. Microbiol. **15**:325–333.

17. **Deng X**, **Li Z**, **Zhang W**. 2012. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. Food Microbiol. **30**:311–315.

18. **Garmiri P**, **Coles KE**, **Humphrey TJ**, **Cogan TA**. 2008. Role of outer membrane lipopolysaccharides in the protection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from desiccation damage. FEMS Microbiol. Lett. **281**:155–159.

19. **Potts M**. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. **58**:755–805.

20. **Breeuwer P**, **Lardeau A**, **Peterz M**, **Joosten HM**. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol. **95**:967–973.

21. **Shaker RR**, **Osaili TM**, **Abu Al-Hasan AS**, **Ayyash MM**, **Forsythe SJ**. 2008. Effect of desiccation, starvation, heat, and cold stresses on the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. J. Food Sci. **73**:M354–M359.

22. **Alpert P**. 2006. Constraints of tolerance: Why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? J. Exp. Biol. **209**:1575–1584.

23. **Yang H-Y**, **Kim S-K**, **Choi S-Y**, **You D-H**, **Lee S-C**, **Bang W-S**, **Yuk H-G**. 2015. Effect of acid, desiccation and heat stresses on the viability of *Cronobacter sakazakii* during rehydration of powdered infant formula and in simulated gastric fluid. Food Control **50**:336–341.

24. **Gruzdev N**, **Pinto R**, **Sela S**. 2011. Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. Appl. Environ. Microbiol. **77**:1667–1673.

25. **Lin L-C**, **Beuchat LR**. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. Food Microbiol. **24**:767–777.

26. **Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL.** 2005. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot. **68**:1900–1902.

27. **Dancer GI, Mah JH, Rhee MS, Hwang IG, Kang DH.** 2009. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. J. Appl. Microbiol. **107**:1606–1614.

28. **Blessington T, Theofel CG, Mitcham EJ, Harris LJ.** 2013. Survival of foodborne pathogens on inshell walnuts. Int. J. Food Microbiol. **166**:341–348.

29. **Nummer BA, Shrestha S, Smith JV.** 2012. Survival of *Salmonella* in a high sugar, low water-activity, peanut butter flavored candy fondant. Food Control **27**:184–187.

30. **He Y, Guo D, Yang J, Tortorello M Lou, Zhang W.** 2011. Survival and heat resistance of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in peanut butter. Appl. Environ. Microbiol. **77**:8434–8438.

31. **Kimber MA, Kaur H, Wang L, Danyluk MD, Harris LJ.** 2012. Survival of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on inoculated almonds and pistachios stored at –19, 4, and 24° C. J. Food Prot. **75**:1394–1403.

32. **Torlak E, Sert D, Serin P.** 2013. Fate of *Salmonella* during sesame seeds roasting and storage of tahini. Int. J. Food Microbiol. **163**:214–217.

33. **Beuchat LR, Mann DA.** 2010. Factors affecting infiltration and survival of *Salmonella* on in-shell pecans and pecan nutmeats. J. Food Prot. **73**:1257–1268.

34. **Delmas G, Le Querrec F, Weill F-X, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Vaillant V.** 2004. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001-2003.Maladie d'origine alimentaires.

35. **Isaacs S, Aramini J, Ciebin B, Farrar JA, Ahmed R, Middleton D, Chandran AU, Harris L, Howes M, Chan E, Pichette AS, Campbell K, Gupta A, Lior L, Pearce M, Clark C, Rodgers F, Jamieson F, Brophy I, Ellis A.** 2005. An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella* Enteritidis. J. Food Prot. **68**:197–198.

36. **Werber D, Dreesman J, Feil F, van Treeck U, Fell G, Ethelberg S, Hauri AM, Roggentin P, Prager R, Fisher IST, Behnke SC, Bartelt E, Weise E, Ellis A, Siitonen A, Andersson Y, Tschäpe H, Kramer MH, Ammon A.** 2005. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. BMC Infect. Dis. **5**:7.

37. **Brockmann S.** 2001. International outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 due to contaminated sesame seed products – update from Germany (Baden-Württemberg).

Eurosurveillance **5**.

38. **Little C**. 2001. International outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 – update from the United Kingdom. Eurosurveillance **5**.

39. **Guérin P**. 2001. International outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 – update from Norway. Eurosurveillance **5**.

40. **Kirk MD**, **Little CL**, **Lem M**, **Fyfe M**, **Genobile D**, **Tan A**, **Threlfall J**, **Paccagnella A**, **Lightfoot D**, **Lyi H**, **McIntyre L**, **Ward L**, **Brown DJ**, **Surnam S**, **Fisher IST**. 2004. An outbreak due to peanuts in their shell caused by *Salmonella* enterica serotypes Stanley and Newport - sharing molecular information to solve international outbreaks. Epidemiol. Infect. **132**:571–577.

41. **CDC**. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **51**:298–300.

42. **Unicomb LE**, **Simmons G**, **Merritt T**, **Gregory J**, **Nicol C**, **Jelfs P**, **Kirk M**, **Tan A**, **Thomson R**, **Adamopoulos J**, **Little CL**, **Currie A**, **Dalton CB**. 2005. Sesame seed products contaminated with *Salmonella*: three outbreaks associated with tahini. Epidemiol. Infect. **133**:1065–1072.

43. **Van Doren JM**, **Neil KP**, **Parish M**, **Gieraltowski L**, **Gould LH**, **Gombas KL**. 2013. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973-2010. Food Microbiol. **36**:456–464.

44. **CDC**. 2004. Outbreak of *Salmonella* serotype Enteritidis infections associated with raw almonds - United States and Canada, 2003-2004. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **53**:484–487.

45. **Koch J**, **Schrauder A**, **Alpers K**, **Werber D**, **Frank C**, **Prager R**, **Rabsch W**, **Broll S**, **Feil F**, **Roggentin P**, **Bockemühl J**, **Tschäpe H**, **Ammon A**, **Stark K**. 2005. *Salmonella* Agona outbreak from contaminated aniseed, Germany. Emerg. Infect. Dis. **11**:1124–1127.

46. **Ledet Müller L**, **Hjertqvist M**, **Payne L**, **Pettersson H**, **Olsson A**, **Plym Forshell L**, **Andersson Y**. 2007. Cluster of *Salmonella* Enteritidis in Sweden 2005-2006 - suspected source: Almonds. Eurosurveillance **12**:E9–E10.

47. **Zhang G**, **Ma L**, **Patel N**, **Swaminathan B**, **Wedel S**, **Doyle MP**. 2007. Isolation of *Salmonella* Typhimurium from outbreak-associated cake mix. J. Food Prot. **70**:997–1001.

48. **CDC**. 2007. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Tennessee infections associated with peanut butter - United States, 2006-2007. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **56**:521–524.

49. **EFSA**. 2009. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic

agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. EFSA J. **223**.

50. **Bruun T**, **Srensen G**, **Forshell LP**, **Jensen T**, **Nygard K**, **Kapperud G**, **Lindstedt BA**, **Berglund T**, **Wingstrand A**, **Petersen RF**, **Müller L**, **Kjelso C**, **Ivarsson S**, **Hjertqvist M**, **Löfdahl S**, **Ethelberg S**. 2009. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. Eurosurveillance **14**:10–15.

51. **CDC**. 2007. Summary statistics for foodborne outbreaks, 2007.

52. **EFSA and ECDC**. 2010. The European Union summary report on trends and sources of zoonotic agents and food borne outbreaks in 2008. EFSA J. **8**:1–368.

53. **CDC**. 2007. *Salmonella* Wandsworth outbreak investigation, June - July 2007.

54. **Sotir MJ**, **Ewald G**, **Kimura AC**, **Higa JI**, **Sheth A**, **Troppy S**, **Meyer S**, **Hoekstra RM**, **Austin J**, **Archer J**, **Spayne M**, **Daly ER**, **Griffin PM**. 2009. Outbreak of *Salmonella* Wandsworth and Typhimurium infections in infants and toddlers traced to a commercial vegetable-coated snack food. Pediatr. Infect. Dis. J. **28**:1041–1046.

55. **Ilic S**, **Duric P**, **Gergo E**. 2010. *Salmonella* Senfenberg infections and fennel seed tea, Serbia. Emerg. Infect. Dis. **16**:893–895.

56. **Foodborne illness database**. 2009. Colorado restaurant refried beans, Spanish rice 2008.

57. **Rodriguez-Urrego J**, **Herrera-Leon S**, **Echeita-Sarriondia A**, **Soler P**, **Simon F**, **Mateo S**, **Investigation team**. 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella* serotype Kedougou associated with infant formula, Spain, 2008. Eurosurveillance **15**:19582.

58. **CDC**. 2008. Multistate outbreak of *Salmonella* Agona infections linked to rice and wheat puff cereal (FINAL UPDATE).

59. **Safe food international**. 2008. Europe: Food Safety Studies 2008.

60. **CDC**. 2009. Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections linked to peanut butter, 2008-2009 (FINAL UPDATE).

61. **CDC**. 2009. Multistate outbreak of *Salmonella* infections associated with peanut butter and peanut butter - containing products - United States, 2008-2009. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **58**:1–6.

62. **Sheppard YD**, **Middleton D**, **Eld YW**, **Tyndel F**, **Haider S**, **Spiegelman J**, **Swartz RH**, **Nelder MP**, **Baker SL**, **Landry L**, **Maceachern R**, **Deamond S**, **Ross L**, **Peters G**, **Baird M**, **Rose D**, **Sanders G**, **Austin JW**. 2012. Intestinal toxemia botulism in 3 adults, Ontario, Canada, 2006-2008. Emerg. Infect. Dis. **18**:1–6.

63. **Jourdan N**, **Le Hello S**, **Delmas G**, **Clouzeau J**, **Manteau C**, **Desaubliaux B**, **Chagnon V**, **Thierry-Bled F**, **Demare N**, **Weill F**, **de Valk H**. 2008. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype gives infections in infants in France, linked to infant milk formula, September 2008. Eurosurveillance **13**:38–39.

64. **Neil KP**, **Biggerstaff G**, **MacDonald JK**, **Trees E**, **Medus C**, **Musser KA**, **Stroika SG**, **Zink D**, **Sotir MJ**. 2012. A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough - United States, 2009. Clin. Infect. Dis. **54**:511–518.

65. **CDC**. 2010. *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated imported black and red pepper - United States, July 2009-April 2010. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **59**:1647–1650.

66. **CDC**. 2013. Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 infections associated with sprout consumption — Europe and North America, May – July 2011. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **62**:1029–1031.

67. **CDC**. 2011. Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with in-shell hazelnuts (FINAL UPDATE).

68. **Bedard B**, **Kennedy BS**, **Weimer AC**. 2014. Geographical information software and shopper card data, aided in the discovery of a *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with Turkish pine nuts. Epidemiol. Infect. **142**:2567–2571.

69. **CDC**. 2012. Multistate outbreak of *Salmonella* Bredeney infections linked to peanut butter manufactured by Sunland, Inc. (FINAL UPDATE).

70. **CDC**. 2012. Multistate outbreak of human *Salmonella* Infantis infections linked to dry dog food (FINAL UPDATE).

71. **Astley M**. 2012. Belgia baby formula-linked to *Salmonella* outbreak siskens 16 in Russia. Food Qual. news.

72. **DGCCRF**. 2009. Guide d'aide à la géstion des alertes d'origines alimentaire entre les exploitants de la chaîne alimentaire et l'administration lorsqu'un produit ou un lot de produits est identifié.

73. **FDA**. Recalls, market withdrawals, & safety alerts search.

74. **Forsythe S**. 2014. Powdered infant formula, p. 177–211. *In* Gurtler, JB, Doyle, MP, Kornacki, JL (eds.), The microbiological safety of low water activity foods and spices. Springer science+business media, LLC, London.

75. **Codex Alimentarius**. 2008. Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children.

76. **Weissman JB, Deen AD, Williams M, Swanston N, Ali S**. 1977. An island wide epidemic of salmonellosis in Trinidad traced to contaminated powdered milk. West Indian Med. J. **26**:135–143.

77. **Rowe B, Hutchinson DN, Gilbert RJ, Hales BH, Begg NT, Dawkins HC, Jacob M, Rae FA, Jepson M**. 1987. *Salmonella* Ealing infections associated with consuption of infant dried milk. Lancet **2**:900–903.

78. **Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsson O**. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J. Clin. Microbiol. **27**:2054–2056.

79. **CDC**. 1993. *Salmonella* serotype Tennessee in powdered milk products and infant formula - Canada and United States, 1993. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **42**:516–517.

80. **Rushdy AA, Stuart JM, Ward LR, Bruce J, Threlfall EJ, Punia P, Bailey JR**. 1998. National outbreak of *Salmonella* Senftenberg associated with infant food. Epidemiol. Infect. **120**:125–8.

81. **Usera MA, Echeita A, Aladuena A, Blanco MC, Reymundo R, Prieto MI, Tello O, Cano R, Herrera D, Martinez-Navarro F**. 1996. Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella* Virchow. Eur. J. Epidemiol. **12**:377–381.

82. **Threlfall EJ, Ward LR, Hampton MD, Ridley AM, Rowe B, Roberts D, Gilbert RJ, Van Someren P, Wall PG, Grimont P**. 1998. Molecular fingerprinting defines a strain of *Salmonella enterica* serotype Anatum responsible for an international outbreak associated with formula-dried milk. Epidemiol. Infect. **121**:289–293.

83. **van Acker J, Smet F De, Muyldermans G, Naessens A, Lauwers S, Muyldermans T a N, Acker JOSV a N, Smet FDE**. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula **39**:7–12.

84. **Park J, Seok W, Choi B, Kim H, Lim B, Yoon S, Kim S, Kim Y, Park J**. 2004. *Salmonella enterica* serovar london infections associated with consumtion of infant formulae. Yonsei Med. J. **45**:43–48.

85. **Institut de veille sanitaire**. 2006. Infections à *Enterobacter sakazakii* associées à la consommation d'une préparation en poudre pour nourrissons.

86. **Finn S, Condell O, McClure P, Amézquita A, Fanning S**. 2013. Mechanisms of survival,

responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. Front. Microbiol. **4**:1–15.

87. **Brenner FW**, **Villar RG**, **Angulo FJ**, **Tauxe R**. 2000. *Salmonella* nomenclature. J. cinical Microbiol. **38**:2465–2467.

88. **Gomez TM**, **Motarjemi Y**, **Miyagawa S**, **Käferstein FK**, **Stöhr K**. 1997. Foodborne salmonellosis. Lancet **50**:81–89.

89. **Hohmann EL**. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. Clin. Infect. Dis. **32**:263–269.

90. **Bäumler AJ**. 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. Trends Microbiol. **5**:318–122.

91. **Grimont P**, **Weill F-X**. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars.WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.

92. **Andrews-Polymenis HL**, **Bäumler AJ**, **McCormick BA**, **Fang FC**. 2010. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. Infect. Immun. **78**:2356–2369.

93. **Ibarra JA**, **Steele-Mortimer O**. 2009. *Salmonella* - the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. Cell. Microbiol. **11**:1579–1586.

94. **Iversen C**, **Mullane N**, **McCardell B**, **Tall BD**, **Lehner A**, **Fanning S**, **Stephan R**, **Joosten H**. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**:1442–1447.

95. **Joseph S**, **Cetinkaya E**, **Drahovska H**, **Levican A**, **Figueras MJ**, **Forsythe SJ**. 2012. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**:1277–1283.

96. **Lai KK**. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine (Baltimore). **80**:113–122.

97. **Bowen AB**, **Braden CR**. 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. Emerg. Infect. Dis. **12**:1185–1189.

98. **Breeuwer P**. 2014. Adaptation of pathogenic microorganisms to dry conditions, p. 37–48. *In* Gurtler, JB, Doyle, MP, Kornacki, JL (eds.), The microbiological safety of low water activity foods and spices. Springer science+business media, LLC, London.

99. **Billi D**, **Potts M**. 2002. Life and death of dried prokaryotes. Res. Microbiol. **153**:7–12.

100. **Potts M**. 2001. Desiccation tolerance: A simple process? Trends Microbiol. **9**:553–559.

101. **Dupont S**, **Rapoport A**, **Gervais P**, **Beney L**. 2014. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. Appl. Microbiol. Biotechnol. **98**:8821–8834.

102. **Spector MP**, **Kenyon WJ**. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. Food Res. Int. **45**:455–481.

103. **Beales N**. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **3**:1–20.

104. **Feeney A**, **Sleator RD**. 2011. An *in silico* analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen *Cronobacter sakazakii*. Bioeng. Bugs **2**:260–270.

105. **Sleator RD**, **Hill C**. 2002. Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol. Rev. **26**:49–71.

106. **Finn S**, **Händler K**, **Condell O**, **Colgan A**, **Cooney S**, **McClure P**, **Amézquita A**, **Hinton JCD**, **Fanning S**. 2013. ProP is required for the survival of desiccated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells on a stainless steel surface. Appl. Environ. Microbiol. **79**:4376–4384.

107. **Gruzdev N**, **McClelland M**, **Porwollik S**, **Ofaim S**, **Pinto R**, **Saldinger-Sela S**. 2012. Global transcriptional analysis of dehydrated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Appl. Environ. Microbiol. **78**:7866–7875.

108. **Riedel K**, **Lehner A**. 2007. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. Proteomics **7**:1217–1231.

109. **Morgan CA**, **Herman N**, **White PA**, **Vesey G**. 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. J. Microbiol. Methods **66**:183–193.

110. **Howells AM**, **Bullifent HL**, **Dhaliwal K**, **Griffin K**, **García de Castro A**, **Frith G**, **Tunnacliffe A**, **Titball RW**. 2002. Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Res. Microbiol. **153**:281–287.

111. **Forst SA**, **Roberts DL**. 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. Res. Microbiol. **145**:363–373.

112. **Quinn HJ**, **Cameron ADS**, **Dorman CJ**. 2014. Bacterial regulon evolution: Distinct responses and roles for the identical OmpR proteins of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* in the acid stress response. PLoS Genet. **10**:e1004215.

113. **Wang LC**, **Morgan LK**, **Godakumbura P**, **Kenney LJ**, **Anand GS**. 2012. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. EMBO

J. **31**:2648–2659.

114. **Alvarez-Ordóñez A**, **Cummins C**, **Deasy T**, **Clifford T**, **Begley M**, **Hill C**. 2014. Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*. Int. J. Food Microbiol. **178**:21–28.

115. **Abee T**, **Groot MN**, **Tempelaars M**, **Zwietering M**, **Moezelaar R**, **van der Voort M**. 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. Food Microbiol. **28**:199–208.

116. **Cai SJ**, **Inouye M**. 2002. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **277**:24155–24161.

117. **Jung K**, **Altendorf K**. 2002. Towards an understanding of the molecular mechanisms of stimulus perception and signal transduction by the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*. J. Mol. Microb. Biotechnol. **4**:223–228.

118. **Balaji B**, **Connor KO**, **Lucas JR**, **Anderson JM**, **Csonka LN**. 2005. Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium , determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. **71**:8273–8283.

119. **Farewell A**, **Kvint K**, **Nyström T**. 1998. Negative regulation by RpoS: A case of sigma factor competition. Mol. Microbiol. **29**:1039–1051.

120. **Bougdour A**, **Cunning C**, **Baptiste PJ**, **Elliott T**, **Gottesman S**. 2008. Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. Mol. Microbiol. **68**:298–313.

121. **Hengge-Aronis R**. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigmaS (RpoS) subunit of RNA polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**:373–395.

122. **Battesti A**, **Majdalani N**, **Gottesman S**. 2011. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. **65**:189–213.

123. **Battesti A**, **Majdalani N**, **Gottesman S**. 2015. Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. **112**:5159–5164.

124. **Lease RA**, **Belfort M**. 2000. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. Proc. Natl. Acad. Sci. **97**:9919–9924.

125. **Majdalani N**, **Chen S**, **Murrow J**, **Saint John K**, **Gottesman S**. 2001. Regulation of RpoS by a novel small RNA: The characterization of RprA. Mol. Microbiol. **39**:1382–1394.

126. **Li J, Nakayasu ES, Overall CC, Johnson RC, Kidwai AS, McDermott JE, Ansong C, Heffron F, Cambronne ED, Adkins JN**. 2015. Global analysis of *Salmonella* alternative sigma factor E on protein translation. J. Proteome Res. **14**:1716–1726.

127. **Bennett GM, Seaver A, Calcottt PH**. 1981. Effect of defined lipopolysaccharide core defects on resistance of *Salmonella* Typhimurium to freezing and thawing. Appl. Environ. Microbiol. **42**:843–849.

128. **Vestby LK, Møretrø T, Ballance S, Langsrud S, Nesse LL**. 2009. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. BMC Vet. Res. **5**:43.

129. **White AP, Gibson DL, Kim W, Kay WW, Surette MG**. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. J. Bacteriol. **188**:3219–3227.

130. **Hartmann I, Carranza P, Lehner A, Stephan R, Eberl L, Riedel K**. 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. **76**:2251–2261.

131. **Grimm M, Stephan R, Iversen C, Manzardo GG, Rattei T, Riedel K, Ruepp A, Frishman D, Lehner A**. 2008. Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. J. Food Prot. **71**:13–18.

132. **Ophir T, Gutnick DL**. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl. Environ. Microbiol. **60**:740–745.

133. **Costerton JW, Irvin RT**. 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. **35**:299–324.

134. **Parsegian VA, Rand RP, Rau DC**. 1995. Energetics of biological macromolecules. Methods Enzymol. **259**:43–94.

135. **Dowhan W**. 1997. Molecular basisi for membrane phospholipid diversity:Why are there so many lipids? Annu. Rev. Biochem. **66**:199–232.

136. **Kinnunen PKJ, Kõiv A, Lehtonen JYA, Rytömaa M, Mustonen P**. 1994. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. Chem. Phys. Lipids **73**:181–207.

137. **Hatanaka Y, Kinoshita K, Yamazaki M**. 1997. Osmotic stress induces a phase transition from interdigitated gel phase to bilayer gel phase in multilamellar vesicles of dihexadecylphosphatidylcholine. Biophys. Chem. **65**:229–233.

138. **Biondi A, Féliz M, Disalvo E**. 1991. Surface changes induced by osmotic s ress and its influence on the glycerol permeability in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta **1069**:5–13.

139. **Alemohammad MM**, **Knowles CJ**. 1974. Osmotically induced volume and turbidity changes of *Escherichia coli* due to salts, sucrose and glycerol, with particular reference to the rapid permeation of glycerol into the cell. J. Gen. Microbiol. **82**:125–142.

140. **Dupont S**. 2011. Implication de la membrane plasmique dans la survie de *Saccharomyces cerevisiae* lors de perturbation hydriques : Rôle clé de l'ergostérol. Université de bourgogne.

141. **Djelal H**, **Larher F**, **Martin G**, **Amrane A**. 2012. Impact of an osmotic stress on the intracellular volume of *Hansenula anomala*. Ann. Microbiol. **62**:1345–1351.

142. **Mille Y**, **Beney L**, **Gervais P**. 2003. Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. Biotechnol. Bioeng. **83**:578–582.

143. **Woldringh CL**. 1994. Significance of plasmolysis spaces as markers for periseptal annuli and adhesion sites. Mol. Microbiol. **14**:597–607.

144. **Schwarz H**, **Koch AL**. 1995. Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall. Microbiology **141**:3161–3170.

145. **Schwechheimer C**, **Sullivan CJ**, **Kuehn MJ**. 2013. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. Biochemistry **52**:3031–40.

146. **Simonin H**, **Beney L**, **Gervais P**. 2007. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. Biochim. Biophys. Acta **1768**:1600–1610.

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

148. **Trofimova Y**, **Walker G**, **Rapoport A**. 2010. Anhydrobiosis in yeast: Influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration-rehydration. FEMS Microbiol. Lett. **308**:55–61.

149. **Sinha RN**, **Shukla AK**, **Madan LAL**, **Ranganathan B**. 1982. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. J. Food Sci. **47**:668–669.

150. **Leslie SB**, **Israeli E**, **Lighthart B**, **Crowe JH**, **Crowe LM**. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl. Environ. Microbiol. **61**:3592–3597.

151. **Shen S**, **Fang FC**. 2012. Integrated stress responses in *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol.

152:75–81.

152. **Fang FC**. 2005. Sigma cascades in prokaryotic regulatory networks. Proc. Natl. Acad. Sci. **102**:4933–4934.

153. **Richter K**, **Haslbeck M**, **Buchner J**. 2010. The heat shock response: Life on the verge of death. Mol. Cell **40**:253–266.

154. **Bang I-S**, **Frye JG**, **McClelland M**, **Velayudhan J**, **Fang FC**. 2005. Alternative sigma factor interactions in *Salmonella*: sigmaE and sigmaH promote antioxidant defences by enhancing sigmaS levels. Mol. Microbiol. **56**:811–823.

155. **Arroyo C**, **Cebrián G**, **Condón S**, **Pagán R**. 2012. Development of resistance in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to thermal and nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions. J. Appl. Microbiol. **112**:561–570.

156. **Blackburn CW**, **Curtis LM**, **Humpheson L**, **Billon C**, **McClure PJ**. 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. Int. J. Food Microbiol. **38**:31–44.

157. **Yang Y**, **Khoo WJ**, **Zheng Q**, **Chung H-J**, **Yuk H-G**. 2014. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. Int. J. Food Microbiol. **172**:102–109.

158. **Beuchat LR**, **Kim H**, **Gurtler JB**, **Lin L-C**, **Ryu J-H**, **Richards GM**. 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int. J. Food Microbiol. **136**:204–13.

159. **Lianou A**, **Koutsoumanis KP**. 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. Food Microbiol. **28**:828–837.

160. **Lianou A**, **Koutsoumanis KP**. 2013. Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. Food Microbiol. **34**:259–267.

161. **Booth IR**. 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.

162. **Olsen JE**, **Hoegh-Andersen KH**, **Casadesús J**, **Rosenkranzt J**, **Chadfield MS**, **Thomsen LE**. 2013. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S.* Typhimurium. BMC Microbiol. **13**:67.

163. **Partridge JD**, **Harshey RM**. 2013. More than motility: *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. J. Bacteriol.

195:919–929.

164. **Kojima S**, **Blair DF**. 2004. The bacterial flagellar motor: Structure and function of a complex molecular machine. Int. Rev. Cytol. **233**:93–134.

165. **McQuiston JR**, **Fields PI**, **Tauxe R V.**, **Logsdon JM**. 2008. Do *Salmonella* carry spare tyres? Trends Microbiol. **16**:142–148.

166. **Mafu AA**, **Plumety C**, **Deschênes L**, **Goulet J**. 2011. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: Influence of pH of culture. Int. J. Microbiol.

167. **Wagner C**, **Hensel M**. 2011. Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*, p. 17–34. *In* Linke, D, Goldman, A (eds.), Bacterial Adhesion. Springer science+business media, LLC.

168. **Shi J**, **Casanova JE**. 2006. Invasion of host cells by *Salmonella* Typhimurium requires focal adhesion kinase and p130Cas. Mol. Biol. Cell **17**:4698–4708.

169. **Dostal A**, **Gagnon M**, **Chassard C**, **Zimmermann MB**, **O'Mahony L**, **Lacroix C**. 2014. *Salmonella* adhesion, invasion and cellular immune responses are differentially affected by iron concentrations in a combined *in vitro* gut fermentation-cell model. PLoS One **9**:e93549.

170. **Kline KA**, **Fälker S**, **Dahlberg S**, **Normark S**, **Henriques-Normark B**. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. Cell host microbe **5**:580–592.

171. **Gerlach RG**, **Hensel M**. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. Int. J. Med. Microbiol. **297**:401–415.

172. **Yue M**, **Rankin SC**, **Blanchet RT**, **Nulton JD**, **Edwards RA**, **Schifferli DM**. 2012. Diversification of the *Salmonella* fimbriae: A model of macro- and microevolution. PLoS One **7**:e38596.

173. **Fàbrega A**, **Vila J**. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. Clin. Microbiol. Rev. **26**:308–341.

174. **Zavyalov V**, **Zavialov A**, **Zav'Yalova G**, **Korpela T**. 2010. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: Structure and function from a clinical standpoint. FEMS Microbiol. Rev. **34**:317–378.

175. **van der Velden AWM**, **Bäumler AJ**, **Tsolis RM**, **Heffron F**. 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. Infect. Immun. **66**:2803–2808.

176. **Pizarro-Cerdá J**, **Cossart P**. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell **124**:715–27.

177. **Niemann HH**, **Schubert W-D**, **Heinz DW**. 2004. Adhesins and invasins of pathogenic

bacteria: A structural view. Microbes Infect. **6**:101–112.

178. **Stevens MP**, **Humphrey TJ**, **Maskell DJ**. 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. **364**:2709–2723.

179. **Kingsley RA**, **Santos RL**, **Keestra AM**, **Adams LG**, **Bäumler AJ**. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. Mol. Microbiol. **43**:895–905.

180. **Schwarz-Linek U**, **Werner JM**, **Pickford AR**, **Gurusiddappa S**, **Kim JH**, **Pilka ES**, **Briggs J a G**, **Gough TS**, **Höök M**, **Campbell ID**, **Potts JR**. 2003. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. Nature **423**:177–81.

181. **Galán JE**, **Wolf-Watz H**. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature **444**:567–573.

182. **Bhunia AK**. 2008. *Salmonella enterica*, p. 201–216. *In* Heldman, DR (ed.), Foodborne microbial pathogens. Springer science+business media, LLC, New-York.

183. **Valdez Y**, **Ferreira RBR**, **Finaly BB**. 2009. Molecular mechanisms of *Salmonella virlence* and host resistance, p. 93–127. *In* Sasakawa, C (ed.), Molecular mechanisms of bacterial infectrion via gut. Springer science+business media, LLC.

184. **Rottner K**, **Stradal TEB**, **Wehland J**. 2005. Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. Dev. Cell **9**:3–17.

185. **Deane JE**, **Abrusci P**, **Johnson S**, **Lea SM**. 2010. Timing is everything: The regulation of type III secretion. Cell. Mol. life Sci. **67**:1065–1075.

186. **Schlumberger MC**, **Hardt W-D**. 2006. *Salmonella* type III secretion effectors: Pulling the host cell's strings. Curr. Opin. Microbiol. **9**:46–54.

187. **Ramsden AE**, **Holden DW**, **Mota LJ**. 2007. Membrane dynamics and spatial distribution of *Salmonella*-containing vacuoles. Trends Microbiol. **15**:516–524.

188. **Böhme L**, **Rudel T**. 2009. Host cell death machinery as a target for bacterial pathogens. Microbes Infect. **11**:1063–1070.

189. **Faherty CS**, **Maurelli AT**. 2008. Staying alive: Bacterial inhibition of apoptosis during infection. Trends Microbiol. **16**:173–180.

190. **Lamkanfi M**, **Dixit VM**. 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. Cell Host Microbe **8**:44–54.

191. **Kim M**, **Ashida H**, **Ogawa M**, **Yoshikawa Y**, **Mimuro H**, **Sasakawa C**. 2010. Bacterial interactions with the host epithelium. Cell Host Microbe **8**:20–35.

192. **McGhie EJ**, **Brawn LC**, **Hume PJ**, **Humphreys D**, **Koronakis V**. 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr. Opin. Microbiol. **12**:117–124.

193. **Patel JC**, **Galán JE**. 2005. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* — all in the name of entry. Curr. Opin. Microbiol. **8**:10–15.

194. **Santos RL**, **Bäumler AJ**. 2004. Cell tropism of *Salmonella enterica*. Int. J. Med. Microbiol. **294**:225–233.

195. **Dandekar T**, **Fieselmann A**, **Fischer E**, **Popp J**, **Hensel M**, **Noster J**. 2014. *Salmonella*-how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. Front. Cell. Infect. Microbiol. **4**:191.

196. **Seth-Smith HMB**, **Fookes MC**, **Okoro CK**, **Baker S**, **Harris SR**, **Scott P**, **Pickard D**, **Quail MA**, **Churcher C**, **Sanders M**, **Harmse J**, **Dougan G**, **Parkhill J**, **Thomson NR**. 2012. Structure, diversity, and mobility of the *Salmonella* pathogenicity island 7 family of integrative and conjugative elements within *Enterobacteriaceae*. J. Bacteriol. **194**:1494–14504.

197. **Clements M**, **Eriksson S**, **Tezcan-merdol D**, **Hinton JCD**, **Rhen M**. 2001. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. Ann. Med. **33**:178–185.

198. **Groisman EA**, **Ochman H**. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. Trends Microbiol. **5**:343–349.

199. **Jacobsen A**, **Hendriksen RS**, **Aaresturp FM**, **Ussery DW**, **Friis C**. 2011. The *Salmonella enterica* pan-genome. Microb. Ecol. **62**:487–504.

200. **Hensel M**. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int. J. Med. Microbiol. **294**:95–102.

201. **Coburn B**, **Grassl GA**, **Finlay BB**. 2007. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. Immunol. Cell Biol. **85**:112–118.

202. **Sturm A**, **Heinemann M**, **Arnoldini M**, **Benecke A**, **Ackermann M**, **Benz M**, **Dormann J**, **Hardt W-D**. 2011. The cost of virulence: Retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. PLoS Pathog. **7**:e1002143.

203. **Zhang S**, **Kingsley RA**, **Santos RL**, **Andrews-Polymenis H**, **Raffatellu M**, **Figueiredo J**, **Nunes J**, **Tsolis RM**, **Adams LG**, **Baumler AJ**. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. Infect. Immun. **71**:1–12.

204. **Darwin KH**, **Miller VL**. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev. **12**:405–428.

205. **Erhardt M**, **Dersch P**. 2015. Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia*

virulence. Front. Microbiol. **6**:949.

206. **Fang FC**, **Libby SJ**, **Buchmeier NA**, **Loewen PC**, **Switala J**, **Harwood J**, **Guiney DG**. 1992. The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. **89**:11978–11982.

207. **Hébrard M**, **Kröger C**, **Sivasankaran SK**, **Händler K**, **Hinton JCD**. 2011. The challenge of relating gene expression to the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Curr. Opin. Biotechnol. **22**:200–210.

208. **Humphreys S**, **Stevenson A**, **Bacon A**, **Weinhardt AB**, **Roberts M**. 1999. The alternative sigma factor, SigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. Infect. Immun. **67**:1560–1568.

209. **Giri CP**, **Shima K**, **Tall BD**, **Curtis S**, **Sathyamoorthy V**, **Hanisch B**, **Kim KS**, **Kopecko DJ**. 2012. *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) invade and translocate across both cultured human intestinal epithelial cells and human brain microvascular endothelial cells. Microb. Pathog. **52**:140–147.

210. **Mohan Nair MK**, **Venkitanarayanan K**. 2007. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatr. Res. **62**:664–669.

211. **Kucerova E**, **Joseph S**, **Forsythe S**. 2011. The *Cronobacter* genus: Ubiquity and diversity. Qual. Assur. Saf. Crop. Foods **3**:104–122.

212. **Kucerova E**, **Clifton SW**, **Xia X-Q**, **Long F**, **Porwollik S**, **Fulton L**, **Fronick C**, **Minx P**, **Kyung K**, **Warren W**, **Fulton R**, **Feng D**, **Wollam A**, **Shah N**, **Bhonagiri V**, **Nash WE**, **Hallsworth-Pepin K**, **Wilson RK**, **McClelland M**, **Forsythe SJ**. 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. PLoS One **5**:e9556.

213. **Kim K**, **Kim KP**, **Choi J**, **Lim JA**, **Lee J**, **Hwang S**, **Ryu S**. 2010. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. **76**:5188–5198.

214. **Nair MKM**, **Venkitanarayanan K**, **Silbart LK**, **Kim KS**. 2009. Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. Foodborne Pathog. Dis. **6**:495–501.

215. **Ye Y**, **Gao J**, **Jiao R**, **Li H**, **Wu Q**, **Zhang J**, **Zhong X**. 2015. The membrane proteins involved in virulence of *Cronobacter sakazakii* virulent G362 and attenuated L3101 isolates. Front. Microbiol. **6**:1238.

216. **Du X, Han R, Li P, Wang S**. 2015. Comparative proteomic analysis of *Cronobacter sakazakii* isolates with different virulences. J. Proteomics **128**:344–351.

217. **Mattick KL, Jørgensen F, Wang P, Pound J, Ward LR, Legan JD, Humphrey TJ**. 2001. Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of *Salmonella* serovars at low water Aactivity. Appl. Environ. Microbiol. **67**:4128–4138.

218. **He Y, Li Y, Salazar JK, Yang J, Tortorello ML, Zhang W**. 2013. Increased water activity reduces the thermal resistance of *Salmonella enterica* in peanut butter. Appl. Environ. Microbiol. **79**:4763–4767.

219. **Laroche C, Gervais P**. 2003. Unexpected thermal destruction of dried, glass bead-immobilized microorganisms as a function of water activity. Appl. Environ. Microbiol. **69**:3015–3019.

220. **Laroche C, Fine F, Gervais P**. 2005. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. Int. J. Food Microbiol. **97**:307–315.

221. **Fine F, Ferret E, Gervais P**. 2005. Thermal properties and granulometry of dried powders strongly influence the effectiveness of heat treatment for microbial destruction. J. Food Prot. **68**:1041–1046.

222. **Allaf T, Besombes C, Mih I, Lefevre L, Allaf K**. 2009. Decontamination of solid and powder foodstuffs using DIC technology, p. 261–282. *In* Schmidt, M (ed.), Advances in computer science and engineering. InTeck.

223. **Sirsat SA, Burkholder KM, Muthaiyan A, Dowd SE, Bhunia AK, Ricke SC**. 2011. Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. J. Appl. Microbiol. **110**:813–822.

224. **Tiganitas A, Zeaki N, Gounadaki AS, Drosinos EH, Skandamis PN**. 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. Int. J. Food Microbiol. **134**:104–12.

225. **Noriega E, Velliou E, Van Derlinden E, Mertens L, Van Impe JFM**. 2013. Effect of cell immobilization on heat-induced sublethal injury of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria innocua*. Food Microbiol. **36**:355–364.

226. **McMeekin T, Bowman J, McQuestin O, Mellefont L, Ross T, Tamplin M**. 2008. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. Int. J. Food Microbiol. **128**:2–9.

227. **van Asselt ED, Zwietering MH**. 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. Int. J. Food Microbiol. **107**:73–82.

228. **Jin T**, **Zhang H**, **Boyd G**, **Tang J**. 2008. Thermal resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* K12 in liquid egg determined by thermal-death-time disks. J. Food Eng. **84**:608–614.

229. **Gabriel AA**, **Nakano H**. 2009. Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. Food Control **20**:443–446.

230. **Arroyo C**, **Condón S**, **Pagán R**. 2009. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. Int. J. Food Microbiol. **136**:110–118.

231. **da Silva do Nascimento M**, **Brum DM**, **Pena PO**, **Berto MI**, **Efraim P**. 2012. Inactivation of *Salmonella* during cocoa roasting and chocolate conching. Int. J. Food Microbiol. **159**:225–229.

232. **Baird-Parker AC**, **Boothroyd M**, **Jones E**. 1970. The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of *Salmonellae*. J. Appl. Bacteriol. **33**:515–522.

233. **Goepfert JM**, **Iskander IK**, **Amundson CH**. 1970. Relation of the heat resistance of salmonellae to the water activity of the environment. Appl. Microbiol. **19**:429–433.

234. **Podolak R**, **Enache E**, **Stone W**, **Black DG**, **Elliott PH**. 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. J. Food Prot. **73**:1919–1936.

235. **FDA**. Food Safety Modernization Act (FSMA).

236. **Sinclair RG**, **Rose JB**, **Hashsham SA**, **Gerba CP**, **Haas CN**, **Haase CN**. 2012. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. Appl. Environ. Microbiol. **78**:1969–1977.

237. **FDA**. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce: Chapter VII. The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh.

238. **Cabrera-Diaz E**, **Moseley TM**, **Lucia LM**, **Dickson JS**, **Castillo A**, **Acuff GR**. 2009. Fluorescent protein-marked *Escherichia coli* biotype I strains as surrogates for enteric pathogens in validation of beef carcass interventions. J. Food Prot. **72**:295–303.

239. **Friedly EC**, **Crandall PG**, **Ricke S**, **O'Bryan C a**, **Martin EM**, **Boyd LM**. 2008. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. J. Food Sci. **73**:M174–M178.

240. **Yang J**, **Bingol G**, **Pan Z**, **Brandl MT**, **McHugh TH**, **Wang H**. 2010. Infrared heating for dry-roasting and pasteurization of almonds. J. Food Eng. **101**:273–280.

241. **Bianchini A**, **Stratton J**, **Weier S**, **Hartter T**, **Plattner B**, **Rokey G**, **Hertzel G**, **Gompa L**, **Martinez B**, **Eskridge AM**. 2012. Validation of extrusion as a killing step for *Enterococcus faecium* in a balanced carbohydrate-protein meal by using a response surface design. J. Food Prot. **75**:1646–1653.

242. **Kopit LM**, **Kim EB**, **Siezen RJ**, **Harris LJ**, **Marco ML**. 2014. Safety of the surrogate microorganism *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 for use in thermal process validation. Appl. Environ. Microbiol. **80**:1899–1909.

243. **Smith AL**, **Perry JJ**, **Marshall JA**, **Yousef AE**, **Barringer SA**. 2014. Oven, microwave, and combination roasting of peanuts: comparison of inactivation of *Salmonella* surrogate *Enterococcus faecium*, color, volatiles, flavor, and lipid oxidation. J. Food Sci. **79**:S1584–S1594.

244. **Enache E**, **Kataoka A**, **Black DG**, **Napier CD**, **Podolak R**, **Hayman MM**. 2015. Development of a dry inoculation method for thermal challenge studies in low-moisture foods by using talc as a carrier for *Salmonella* and a surrogate (*Enterococcus faecium*). J. Food Prot. **78**:1106–1112.

245. **Kataoka A**, **Enache E**, **Black DG**, **Elliott PH**, **Napier CD**, **Podolak R**, **Hayman MM**. 2014. Survival of *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Enterococcus faecium* in peanut paste formulations at two different levels of water activity and fat. J. Food Prot. **77**:1252–1259.

246. **Russell AD**. 2003. Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. Sci. Prog. **86**:115–137.

247. **Tsuchido T**, **Katsui N**, **Takeuchi A**, **Takano M**, **Shibasaki I**. 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. Appl. Environ. Microbiol. **50**:298–303.

248. **Chang C-H**, **Chiang M-L**, **Chou C-C**. 2009. The effect of temperature and length of heat shock treatment on the thermal tolerance and cell leakage of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988. Int. J. Food Microbiol. **134**:184–189.

249. **Yang Y**, **Kadim MI**, **Khoo WJ**, **Zheng Q**, **Setyawati MI**, **Shin Y-J**, **Lee S-C**, **Yuk H-G**. 2014. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. Int. J. Food Microbiol. **191C**:24–31.

250. **Alvarez-Ordóñez A**, **Fernández A**, **López M**, **Arenas R**, **Bernardo A**. 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. Int. J. Food Microbiol. **123**:212–219.

251. **Li P-T**, **Hsiao W-L**, **Yu R-C**, **Chou C-C**. 2013. Effect of heat shock on the fatty acid and protein profiles of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 as well as its growth and survival in the presence of various carbon, nitrogen sources and disinfectants. Food Microbiol. **36**:142–148.

252. **Los DA**, **Murata N**. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim. Biophys. Acta **1666**:142–157.

253. **Horváth I**, **Multhoff G**, **Sonnleitner A**, **Vígh L**. 2008. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. Biochim. Biophys. Acta **1778**:1653–1664.

254. **Vigh L**, **Maresca B**, **Harwood JL**. 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? Trends Biochem. Sci. **23**:369–374.

255. **Mackey BM**, **Miles CA**, **Parsons SE**, **Seymour DA**. 1991. Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. J. Gen. Microbiol. **137**:2361–74.

256. **Osaili TM**, **Shaker RR**, **Abu Al-Hasan AS**, **Ayyash MM**, **Martin EM**. 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation: Determination of D_{10}-value. J. Food Sci. **72**:M85-8.

257. **Farkas J**, **Mohácsi-Farkas C**. 2011. History and future of food irradiation. Trends Food Sci. Technol. **22**:121–126.

258. **Kume T**, **Furuta M**, **Todoriki S**, **Uenoyama N**, **Kobayashi Y**. 2009. Status of food irradiation in the world. Radiat. Phys. Chem. **78**:222–226.

259. **Torlak E**, **Sert D**, **Ulca P**. 2013. Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. Int. J. Food Microbiol. **165**:276–280.

260. **Cheftel JC**. 1995. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. Food Sci. Technol. Int. **1**:75–90.

261. **Colas de la Noue A**, **Espinasse V**, **Perrier-Cornet JM**, **Gervais P**. 2012. High gas pressure: An innovative method for the inactivation of dried bacterial spores. Biotechnol. Bioeng. **109**:1996–2004.

262. **CDC**. 2012. CDC Update: Investigation of *Cronobacter* infections among infants in the United States.

263. **CDC**. 2009. *Cronobacter* species isolation in two infants - New Mexico, 2008. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **58**:1179–1183.

264. **Iaconelli C, Lemetais G, Kechaou N, Chain F, Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Gervais P, Beney L.** 2015. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. J. Biotechnol. **214**:17–26.

265. **Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S**. 2012. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. J. Appl. Microbiol. **113**:1–15.

266. **Jaradat ZW, Ababneh QO, Saadoun IM, Samara NA, Rashdan AM**. 2009. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequ. BMC Microbiol. **9**:225–236.

267. **Friedemann M**. 2007. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. **116**:1–10.

268. **Iversen C, Forsythe S**. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol. **21**:771–777.

269. **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.

270. **Lesn J, Berthet S, Binard S, Rouxel A, Humbert F**. 2000. Changes in culturability and virulence of *Salmonella* Typhimurium during long-term starvation under desiccating conditions. Int. J. Food Microbiol. **60**:195–203.

271. **Skandamis PN, Yoon Y, Stopforth JD, Kendall PA, Sofos JN**. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. Food Microbiol. **25**:294–303.

272. **Fine F, Gervais P**. 2005. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: Strong influence of initial water activity. Environ. Microbiol. **7**:40–46.

273. **Lian F, Zhao W, Yang R, Tang Y, Katiyo W**. 2015. Survival of *Salmonella* enteric in skim milk powder with different water activity and water mobility. Food Control **47**:1–6.

274. **Farakos SMS, Frank JF, Schaffner DW**. 2013. Modeling the influence of temperature, water

activity and water mobility on the persistence of *Salmonella* in low-moisture foods. Int. J. Food Microbiol. **166**:280–93.

275. **Greenspan L.** 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. Res. Natl. Bur. Stand. A- Physic Chem. **81A**:89–96.

276. **Lemetais G**, **Dupont S**, **Beney L**, **Gervais P**. 2012. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. Appl. Microbiol. Biotechnol. **96**:471–480.

277. **Langová J**, **Štencl J**, **Vlášek V**. 2012. Water sorption isotherms of skimmed milk powder within the temperature range of 5–20 ° C. Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun. **LX**:225–230.

278. **R Development Core Team**. 2008. R: A language and Computing, statistical computing. R Found. Stat. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

279. **Beney L**, **Mille Y**, **Gervais P**. 2004. Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**:457–464.

280. **Zhou K**, **George SM**, **Métris A**, **Li PL**, **Baranyi J**. 2011. Lag phase of *Salmonella enterica* under osmotic stress conditions. Appl. Environ. Microbiol. **77**:1758–1762.

281. **Xu YZ**, **Métris A**, **Stasinopoulos DM**, **Forsythe SJ**, **Sutherland JP**. 2015. Effect of heat shock and recovery temperature on variability of single cell lag time of *Cronobacter turicensis*. Food Microbiol. **45**:195–204.

282. **Osaili T**, **Forsythe S**. 2009. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. Int. J. Food Microbiol. **136**:214–220.

283. **Dupont S**, **Beney L**, **Ritt JF**, **Lherminier J**, **Gervais P**. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **1798**:975–985.

284. **Beney L**, **Simonin H**, **Mille Y**, **Gervais P**. 2007. Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative *Bradyrhizobium japonicum* to hyperosmotic treatments. Arch. Microbiol. **187**:387–396.

285. **Karel M**. 1980. Lipid oxidation, secondary reactions and water activity of foods, p. 191–206. *In* Simic, MG, Karel, M (eds.), Autoxidation in Food and Biological Systems. Springer science+business media, LLC.

286. **Himathongkham S**, **Nuanualsuwan S**, **Riemann H**. 1999. Survival of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in chicken manure at different levels of water activity. FEMS Microbiol. Lett. **172**:159–163.

287. **Pehkonen KS**, **Roos YH**, **Miao S**, **Ross RP**, **Stanton C**. 2008. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). J. Appl. Microbiol. **104**:1732–1743.

288. **Shrestha AK**, **Howes T**, **Adhikari BP**, **Bhandari BR**. 2007. Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. LWT - Food Sci. Technol. **40**:1593–1600.

289. **Lianou A**, **Koutsoumanis KP**. 2013. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. Int. J. Food Microbiol. **167**:310–321.

290. **Scherber CM**, **Schottel JL**, **Aksan A**. 2009. Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. **1788**:2427–2435.

291. **Ananta E**, **Volkert M**, **Knorr D**. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. Int. Dairy J. **15**:399–409.

292. **Garbowska M**, **Berthold-Pluta A**, **Stasiak-Różańska L**. 2015. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. Food Microbiol. **49**:1–5.

293. **Meng XC**, **Stanton C**, **Fitzgerald GF**, **Daly C**, **Ross RP**. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. Food Chem. **106**:1406–1416.

294. **Gruzdev N**, **Pinto R**, **Sela Saldinger S**. 2012. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. Food Microbiol. **32**:415–422.

295. **Beney L**, **Gervais P**. 2001. Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). **47**:831–839.

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

297. **Eurostat**. Eurostat database.

298. **Carrasco E**, **Morales-Rueda A**, **García-Gimeno RM**. 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. Food Res. Int. **45**:545–556.

299. **Silva FVM**, **Gibbs P a.** 2012. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. Food Res. Int. **45**:695–699.

300. **Grasso EM**, **Stam CN**, **Anderson NM**, **Krishnamurthy K**. 2014. Heat and steam treatments, p. 403–424. *In* Gurtler, JB, Doyle, MP, Kornacki, JL (eds.), The microbiological safety of low

water activity foods and spices. Springer science+business media, LLC.

301. **Juneja VK**, **Eblen BS**. 2000. Heat inactivation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in beef as affected by fat content. Lett. Appl. Microbiol. **30**:461–467.

302. **Labuza TP**, **Kaanane A**, **Chen JY**. 1985. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. J. Food Sci. **50**:385–391.

303. **Aljarallah KM**, **Adams MR**. 2007. Mechanisms of heat inactivation in *Salmonella* serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures. J. Appl. Microbiol. **102**:153–160.

304. **Dao T**, **Dejardin J**, **Bensoussan M**, **Dantigny P**. 2010. Use of the Weibull model to describe inactivation of dry-harvested conidia of different *Penicillium* species by ethanol vapours. J. Appl. Microbiol. **109**:408–414.

305. **Aragao GMF**, **Corradini MG**, **Normand MD**, **Peleg M**. 2007. Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. Int. J. Food Microbiol. **119**:243–257.

306. **Osaili TM**, **Shaker RR**, **Al-Haddaq MS**, **Al-Nabulsi AA**, **Holley RA**. 2009. Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. J. Appl. Microbiol. **107**:928–935.

307. **Alvarez-Ordóñez A**, **Fernández A**, **López M**, **Bernardo A**. 2009. Relationship between membrane fatty acid composition and heat resistance of acid and cold stressed *Salmonella* Senftenberg CECT 4384. Food Microbiol. **26**:347–353.

308. **Hazel JR**, **Eugene Williams E**. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. Prog. Lipid Res. **29**:167–227.

309. **Marechal PA**, **Gervais P**. 1994. Yeast viability related to water potential variation-influence of the transient phase. Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**:617–622.

310. **Guyot S**, **Pottier L**, **Ferret E**, **Gal L**, **Gervais P**. 2010. Physiological responses of *Escherichia coli* exposed to different heat-stress kinetics. Arch. Microbiol. **192**:651–661.

311. **Rotger R**, **Casadesús J**. 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. Int. Microbiol. **2**:177–184.

312. **Friedemann M**. 2008. *Enterobacter* sakazakii in powdered infant formula. Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz **51**:664–674.

313. **Li H**, **Bhaskara A**, **Megalis C**, **Tortorello M Lou**. 2012. Transcriptomic analysis of *Salmonella*

desiccation resistance. Foodborne Pathog. Dis. **9**:1143–1151.

314. **Lee BH**, **Kermasha S**, **Baker BE**. 1989. Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of Salmonella in thin films of aqueous media and chocolate. Food Microbiol. **6**:143–152.

315. **Stiefel P**, **Schmidt-Emrich S**, **Maniura-Weber K**, **Ren Q**. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. BMC Microbiol. **15**:36.

316. **Davey HM**, **Hexley P**. 2011. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. Environ. Microbiol. **13**:163–171.

317. **Shi L**, **Günther S**, **Hübschmann T**, **Wick LY**, **Harms H**, **Müller S**. 2007. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. Cytom. Part A **71**:592–598.

318. **Amor K Ben**, **Breeuwer P**, **Verbaarschot P**, **Rombouts FM**, **Akkermans ADL**, **De Vos WM**, **Abee T**. 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. Appl. Environ. Microbiol. **68**:5209–5216.

319. **Teal TK**, **Lies DP**, **Wold BJ**, **Newman DK**. 2006. Spatiometabolic stratification of *Shewanella oneidensis* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **72**:7324–7330.

320. **Créach V**, **Baudoux AC**, **Bertru G**, **Rouzic BL**. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. J. Microbiol. Methods **52**:19–28.

321. **Rodriguez GG**, **Phipps D**, **Ishiguro K**. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria **58**:1801–1808.

322. **Hatzinger PB**, **Palmer P**, **Smith RL**, **Peñarrieta CT**, **Yoshinari T**. 2003. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. J. Microbiol. Methods **52**:47–58.

323. **Berridge M V.**, **Herst PM**, **Tan AS**. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnol. Annu. Rev. **11**:127–152.

324. **Ramamurthy T**, **Ghosh A**, **Pazhani GP**, **Shinoda S**. 2014. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. Front. Public Heal. **2**:103.

325. **Oliver JD**. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. **43 Spec No**:93–100.

326. **Fakruddin M**, **Mannan KS Bin**, **Andrews S**. 2013. Viable but nonculturable bacteria: Food safety and public health perspective. ISRN Microbiol. **2013**.

327. **Beuchat LR**, **Scouten AJ**. 2002. Combined effects of water activity, temperature and

chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. J. Appl. Microbiol. **92**:382–395.

328. **Mille Y**, **Beney L**, **Gervais P**. 2002. Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment : A plasma membrane implication. Biochim. Biophys. Acta **1567**:41–48.

329. **Tolker-Nielsen T**, **Molin S**. 1996. Role of ribosome degradation in the death of heat-stressed *Salmonella* Typhimurium. FEMS Microbiol. Lett. **142**:155–160.

330. **Rosenthal LJ**, **Iandolo JJ**. 1970. Thermally induced intracellular alteration of ribosomal ribonucleic acid. J. Bacteriol. **103**:833–835.

331. **Holý O**, **Forsythe S**. 2014. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. J. Hosp. Infect. **86**:169–177.

332. **Cahill SM**, **Wachsmuth IK**, **Costarrica MDL**, **Ben Embarek PK**. 2008. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. Clin. Infect. Dis. **46**:268–273.

333. **Guo MS**, **Gross C a.** 2014. Stress-induced remodeling of the bacterial proteome. Curr. Biol. **24**:R424–R434.

334. **Buchanan RL**, **Smith JL**, **Long W**. 2000. Microbial risk assessment: Dose-response relations and risk characterization. Int. J. Food Microbiol. **58**:159–172.

335. **Koutsoumanis KP**, **Sofos JN**. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. Lett. Appl. Microbiol. **38**:321–326.

336. **Gahan CG**, **Hill C**. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. **50**:93–100.

337. **Jørgensen F**, **Leach S**, **Wilde SJ**, **Davies A**, **Stewart GSAB**, **Humphrey T**. 2000. Invasiveness in chickens, stress resistance and RpoS status of wild-type *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 and serovar Enteritidis phage type 4 strains. Microbiology **146**:3227–3235.

338. **Du H**, **Wang M**, **Luo Z**, **Ni B**, **Wang F**, **Meng Y**, **Xu S**, **Huang X**. 2011. Coregulation of gene expression by sigma factors RpoE and RpoS in *Salmonella enterica* serovar Typhi during hyperosmotic stress. Curr. Microbiol. **62**:1483–1489.

339. **Csonka LN**. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. **53**:121–147.

340. **Andino A**, **Hanning I**. 2015. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and vvirulence differences among serovars. Sci. world J. **2015**.

341. **Dong T**, **Schellhorn HE**. 2009. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. BMC Genomics **10**:349.

342. **Alvarez-Ordóñez A**, **Fernández A**, **Bernardo A**, **López M**. 2009. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. Meat Sci. **81**:65–70.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des publications et exemplaires des publications parues

Publication publiée en premier auteur :

- LANG, E., ZOZ, F., IACONELLI, C., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P. (2016). **Recovery estimation of dried foodborne pathogens is directly related to rehydration kinetics.** *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0160844

Publication acceptée en premier auteur :

- LANG, E., IACONELLI, C., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, J.M. AND GERVAIS, P. (2015). **Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk.** *Food Microbiology*. DOI : 10.1016/j.fm.2016.10.005

Publications soumises en premier auteur :

- LANG, E., CHEMLAL, L., MOLIN, P., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, J.M. AND GERVAIS, P. (2016). **Thermal inactivation of dried foodborne pathogens in milk powder.** Soumise dans *International Journal of Food Microbiology*.

Publications en préparation en premier auteur :

- LANG, E., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P. (En cours de préparation). **Cellular injuries of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* exposed to drying and successive heat treatment**
- LANG, E., ZOZ, F., GUYOT, S., ALVAREZ-MARTIN, P., BENEY, L., PERRIER-CORNET, JM. ET GERVAIS, P. (En cours de préparation). **Virulence of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* in milk powder exposed to drying and successive heat treatment.**

Autres publications :

- ZOZ, F., IACONELLI, C., LANG, E., IDDIR, H., GUYOT, S., GRANDVALET, C., GERVAIS, P., AND BENEY, L. (2016). **Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: A preliminary approach with *Listeria monocytogenes*.** *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0148418
- ZOZ, F., GRANDVALET, C., LANG, E., IACONELLI, C., GERVAIS, P., GUYOT, S., AND BENEY, L. (2016) ***Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: influence of serotype, origin, virulence, and genotype.** Soumise dans *International Journal of Food Microbiology*.

Les formats des articles publiés sont présentés dans l'ordre de la liste ci-dessus.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Recovery Estimation of Dried Foodborne Pathogens Is Directly Related to Rehydration Kinetics

Emilie Lang[1,2], Fiona Zoz[1], Cyril Iaconelli[1], Stéphane Guyot[1], Pablo Alvarez-Martin[2], Laurent Beney[1], Jean-Marie Perrier-Cornet[1], Patrick Gervais[1]*

1 Unité Mixte de Recherche—Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, 21000, Dijon, France, **2** Novolyze, 50 rue de Dijon, 21121, Daix, France

* patrick.gervais@u-bourgogne.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Lang E, Zoz F, Iaconelli C, Guyot S, Alvarez-Martin P, Beney L, et al. (2016) Recovery Estimation of Dried Foodborne Pathogens Is Directly Related to Rehydration Kinetics. PLoS ONE 11(8): e0160844. doi:10.1371/journal.pone.0160844

Editor: Anderson de Souza Sant'Ana, University of Campinas, BRAZIL

Received: March 11, 2016

Accepted: July 26, 2016

Published: August 5, 2016

Copyright: © 2016 Lang et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Novolyze provided support in the form of salaries for authors [EL and PAM] and had a role in decision to publish, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Abstract

Drying is a common process which is used to preserve food products and technological microorganisms, but which is deleterious for the cells. The aim of this study is to differentiate the effects of drying alone from the effects of the successive and necessary rehydration. Rehydration of dried bacteria is a critical step already studied in starter culture but not for different kinetics and not for pathogens. In the present study, the influence of rehydration kinetics was investigated for three foodborne pathogens involved in neonatal diseases caused by the consumption of rehydrated milk powder: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii*. Bacteria were dried in controlled relative humidity atmospheres and then rehydrated using different methods. Our results showed that the survival of the three pathogens was strongly related to rehydration kinetics. Consequently, rehydration is an important step to consider during food safety assessment or during studies of dried foodborne pathogens. Also, it has to be considered with more attention in consumers' homes during the preparation of food, like powdered infant formula, to avoid pathogens recovery.

Introduction

Drying is an environmental and technological perturbation involving a water transfer from a liquid state to a gaseous state, following the a_W gradient which allows the transformation from a liquid to a solid and dried product. Water activity or a_W represents the available water for chemical and biochemical reactions and is theoretically comprised between 0 (no water) and 1 (pure water). During drying, the water activity of products is reduced, preventing bacterial growth and below an a_W of 0.6, no microorganisms can grow. This is the reason why drying is a common method used for the preservation of food products or microorganisms of technological interest such as lactic acid and probiotic bacteria. Several methods can be used to reduce a_W and, consequently, to dry food or microorganisms. Common drying processes are spray-drying, fluidized bed drying and freeze-drying [1,2] and are used to conserve dried food

Competing Interests: EL and PAM are employed by Novolyze. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

products such as herbs, spices or milk. Moreover, drying has a deleterious effect on cells. Indeed, at the beginning of the drying process, evaporation of water causes an increase in the osmotic pressure of the extracellular medium and, consequently, provokes a large cellular water outflow from the cells creating then an osmotic stress which is damaging for cells [3]. Afterward, in the case of drying conducing to products of low a_W, the water removal from extracellular and intracellular media will provoke a direct exposition of cells to oxygen in the air which generates reactive oxygen species in cells and the accumulation of free radicals, creating oxidative stress [3,4]. Damages caused by this stress affect macromolecules and membranes [3,5–9]. Nevertheless, even if drying involves cellular injuries to bacterial cells, dried foods are non-sterilized foods [10] and a large range of microorganisms can survive drying such as fungi, like *Aspergillus* spores, bacteria, like *Salmonella* spp., and viruses, like Norovirus [10,11]. Some of them can be dangerous for consumers' health and this is the reason why a great deal of research is focused on the development of specific decontamination processes [12] for the purpose of achieving a minimal microbial load in dried food according to legal requirements and for consumer health protection.

Assessment of microbial survival in dried products involves a rehydration step that is necessary in the method to restore cellular activities, permitting to reach a physiological a_W. The influence of this step has already been studied for the optimization of preservation processes of lactic acid bacteria and flora with technological purpose in a dried form [1]. For example, Morgan *et al.* (2006) reviewed the impact of rehydration of freeze dried lactic acid bacteria and presented it as the final critical step for the revival of cells after drying. Nevertheless, the rehydration kinetics has not been investigated in foodborne pathogens. Moreover, this step has been neglected in the case of pathogens contaminating dried foods or environments. Accordingly, the current method for microbial safety assessment of dried food products is based on their rehydration in a liquid buffer before diluting and spreading for cultivability measurement. However, the rehydration mode, and particularly rehydration kinetics, could drastically impact the cultivability measurement and could lead to erroneous estimation of pathogenic bacteria. This may pose a risk for the consumer due to an underestimation of pathogenic bacteria. Moreover, dried foods are often rehydrated by the user and therefore the impact of rehydration could also directly impact food contamination and consumer health.

Low-moisture foods are not sterile, therefore they can be involved in foodborne outbreaks. For example, *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and also *Cronobacter sakazakii*, are implicated in outbreaks linked low-moisture foods, such as spices, flour, powdered infant formula (PIF) or herbs [10,11,13,14]. Among bacteria found in dried food products, *Salmonella enterica* is one of the most represented foodborne bacteria every year across the world. Regarding *Cronobacter sakazakii*, even if incidence is low, it is involved in neonatal meningitis with a death rate up to 80%, hence the importance of assessing microbial contamination.

In the present study, we aimed to distinguish the effects of drying alone from the effects of the successive and necessary rehydration in order to investigate the effect of rehydration kinetics after drying on the survival of three pathogens: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg and *Cronobacter sakazakii*.

Materials and Methods

Bacterial strains

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 DSM 10506, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Senftenberg DT104 DSM 10062 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T strains were used for this study. Bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 37°C (+/- 0.1°C) for 24 h,

subsequently five colonies of each bacterium were inoculated in 50 mL of Tryptic Soya Broth (TSB, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and incubated for 8 h at 37°C (+/- 0.1°C). Suspensions were then diluted in 50 mL of fresh TSB in order to adjust an Optical Density at 600 nm (OD_{600}, measured by using a Thermo Scientific, Spectronic 200, Villebon sur Yvette, France) of 0.01 (corresponding approximately to 10^6 CFU/mL) before incubation for 14 h at 37°C (+/- 0.1°C) to reach stationary growth phase cultures.

Drying conditions

Drying atmosphere. For the desiccation of the cellular suspensions, hermetic plastic boxes (20 × 13 × 6 cm) were used, with saturated salt solutions at the bottom which regulated the a_W and therefore the atmosphere RH. Saturated salt solution of lithium chloride, potassium acetate, potassium carbonate and magnesium nitrate (all from Sigma-Aldrich) were used to reach an a_W of 0.11, 0.25, 0.44 and 0.58, respectively, checked using an a_W-meter (+/- 0.003) (Aqualab, Dardilly, France). In the hermetic boxes, a_W permitted to maintain a RH of 11%, 25%, 44% and 58%, respectively, checked with RH sensors (+/- 0.5% RH) (Lascar, Radiospare, France). Internal atmospheres were stirred using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) and all experiments were performed at room temperature.

Preparation of the initial cell suspension. The cell concentration of the stationary growth phase culture was checked and adjusted to 1×10^8 CFU/mL through the measurement of the OD_{600}. 25 mL of each culture were centrifuged (3,400 g, 10 min at 25°C, Eppendorf 5810 R, Montesson, France) and washed twice with an equal volume of PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). In a final step, the supernatant was removed and cell pellets were suspended in 25 mL of PBS. The final bacterial number was checked by measuring OD_{600}. The final cells counts were determined by plating on TSA. Plates were incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C) and bacterial concentration was expressed in CFU/mL (Colony Forming Unit/mL).

Rehydration impact after different drying intensities

Drying and instantaneous rehydration. For each experiment, a droplet (10 μL) of bacterial suspensions was spread in a thin layer onto a glass Petri dish (with 3 cm diameter) which was placed at 58%, 44%, 25% and 11% RH during 90 min. After the desiccation, cells were rehydrated by instantaneous (1 s) addition of 990 μL of PBS (a_W = 0.995, checked using an a_W-meter) and homogenization by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France). Then, cells were diluted in PBS (a_W = 0.995) and counted by plating on TSA (a_W = 0.995) incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C) (Fig 1(A)).

Drying and rapid rehydration. Droplets (10 μL) of same bacterial suspensions were dried in the same way as for instantaneous rehydration. After the drying, cells were rehydrated by addition of 990 μL of concentrated PBS (noted cPBS, a_W = 0.950, checked using an a_W-meter) and homogenized by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France), corresponding to the first rehydration step. The use of cPBS (a_W = 0.950) resulted in the partial rehydration of bacterial cells up to an a_W of 0.950 (compared to PBS with a_W = 0.995) imposing a supplementary step before total rehydration of the bacterial cells at an a_W of 0.995. After 30 s, for the second step, dilution was performed in PBS (a_W = 0.995) and counted by plating on TSA (a_W = 0.995) incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C) (Fig 1(B)).

Drastic drying and slow rehydration rates

Droplets (10 μL) of bacterial suspensions were spread in thin layer on glass. They were placed at 11% RH for 90 min, i.e. the more drastic drying condition. After the drying, cells were

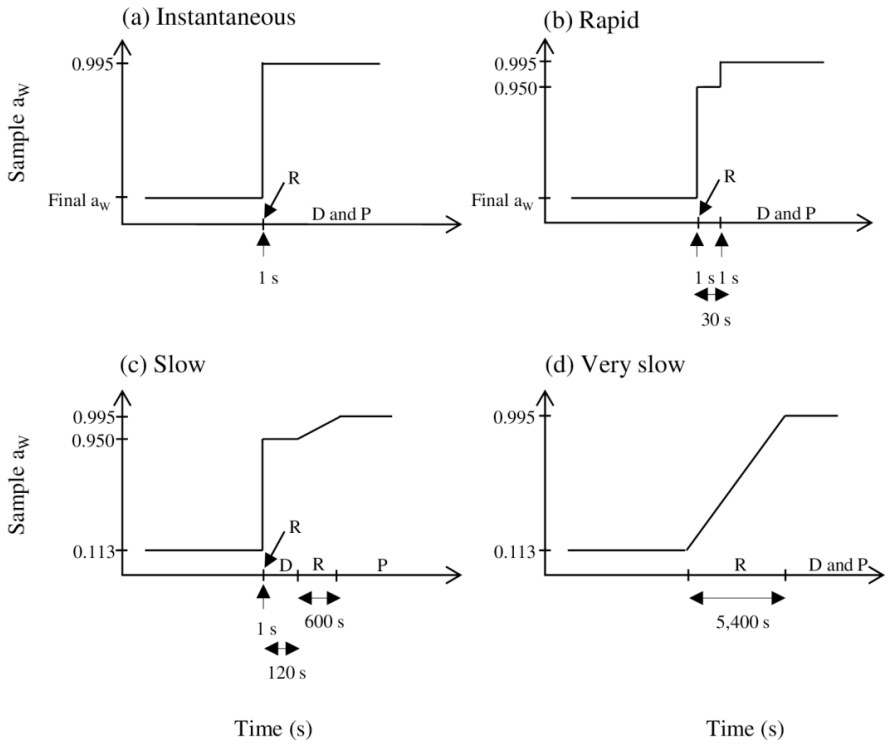

Fig 1. Scheme of different rehydration methods used in this study. (a) Instantaneous rehydration in PBS at 0.995 for 1 s. (b) Rapid rehydration in cPBS (concentrated PBS) at 0.950 (about 1 s), holding time at 0.950 for 30 s and diluting in PBS at 0.995 for 1 s before plating. (c) Slow rehydration in cPBS at 0.950 for 1 s and holding at 0.950 by diluting in cPBS for 2 min before plating during which ramp rehydration (i.e. a progressive evolution of rehydration level) occurred on Petri dishes for about 10 min to reach an a_W of 0.995. (d) Very slow rehydration by placing bacteria in a 100% RH atmosphere for 90 min before diluting and plating. R: Rehydration. D: Dilution. P: Plating. Even if only drying at an a_W of 0.11 was presented, rehydration presented in (a) and (b) were also performed to reach an a_W of 0.58, 0.44 and 0.25 in atmosphere RH at 58%, 44% and 25%.

doi:10.1371/journal.pone.0160844.g001

rehydrated by two other complementary methods: (i) a slow rehydration was performed such as previously in cPBS but the successive dilution were performed in cPBS to maintain bacteria at 0.950, 10 μL of each dilution was dropped on a TSA plate with an a_W = 0.995 (see Fig 1(C) for the corresponding scheme). This drop on the TSA media involved then a linear increase of the cell suspension a_W (from 0.950 to 0.995). Cells were counted by plating on TSA incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C). The second complementary rehydration method is (ii) a very slow rehydration which was performed by placing dried bacteria in an atmosphere maintained at 100% RH (checked using an RH sensor) thanks to vapor transfer from distilled water at room temperature for 90 min permitting bacteria to reach an a_W of 0.995. Cells were then homogenized by pipetting and then counted by diluting in PBS (a_W = 0.995) and plating on TSA incubated for 24 h at 37°C (+/- 0.1°C) (see Fig 1(D) for the corresponding scheme).

Statistical analysis

The loss of cultivability was expressed in $\log_{10}(N/N_0)$, where N represents the bacterial concentration (CFU/mL) after the drying/rehydration cycle and N_0 represents the bacterial

concentration (CFU/mL) before stress, for each condition. All experiments were performed in completely independent triplicates, from independent subcultures and cultures. With the purpose of comparing the various results obtained in this study, first the variance homogeneity (F-test) was tested and then (if $p > 0.05$) an ANOVA or a *t*-test were performed. For significant ANOVA, Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was achieved. Analyses were performed on R software.

Results

Rehydration impact after different drying intensities

After drying at different RH, bacteria were rehydrated in two different manners: (i) instantaneous rehydration and (ii) rapid rehydration (Fig 1(A) and 1(B)). The loss of cultivability after drying and rehydration is represented in Fig 2. A significant difference was observed in bacteria survival with a significant effect of species (ANOVA, $p < 0.05$) and a highly significant effect of rehydration (ANOVA, $p < 0.01$).

Concerning *S*. Typhimurium (Fig 2(B)), the loss of cultivability was higher when instantaneous rehydration was used than when rapid rehydration was used. A significant difference ($p < 0.05$) was detected between both rehydration conditions after a drying at 11% RH, 44% RH and 58% RH. In the cases of *C. sakazakii* (Fig 2(A)) and of *S*. Senftenberg (Fig 2(C)), on the other hand, a significant difference ($p < 0.05$) was only observed in the 58% RH condition, with a more important loss of cultivability after an instantaneous rehydration than after a rapid rehydration.

Rehydration impact after a drastic drying

In order to explore the effect of rehydration kinetics, two supplementary types of slower rehydration were then performed after drying in drastic conditions (11% RH): (i) slow rehydration and (ii) very slow rehydration (Fig 1(C) and 1D)). The data for loss of cultivability obtained with these new rehydration modes were compared with the previous results obtained with instantaneous and rapid rehydration in the same drying conditions (11% RH) and presented in Fig 3. A highly significant difference was observed for loss of cultivability in the four rehydration kinetics (ANOVA, $p < 0.001$).

For *S*. Typhimurium (Fig 3(B)), differences among loss of cultivability were observed using instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration, with no difference between rapid and slow rehydration. A difference of 2 log was observed when comparing the two extreme rehydration modes: instantaneous and very slow rehydration. Regarding *S*. Senftenberg (Fig 3(C)), differences in loss of cultivability were observed in the different rehydration modes used in this study. Two groups were significantly different ($p < 0.05$), represented by the two fastest rehydration kinetics and the two slowest rehydration kinetics. The difference between the instantaneous and very slow rehydration modes represented 2.7 log. Concerning *C. sakazakii* (Fig 3 (A)), results similar to those observed for *S*. Senftenberg were obtained. A difference of 1.25 log was noted between instantaneous and very slow rehydration.

Consequently, the rehydration kinetics was primarily responsible for the loss of cultivability obtained after a drying/rehydration cycle.

Discussion

These results obtained in our study clearly show that the inactivation usually and totally attributed to drying is in fact due to a combination of drying and of rehydration. This phenomenon has previously been observed in probiotics [15], lactic acid bacteria [16] or yeast [17,18].

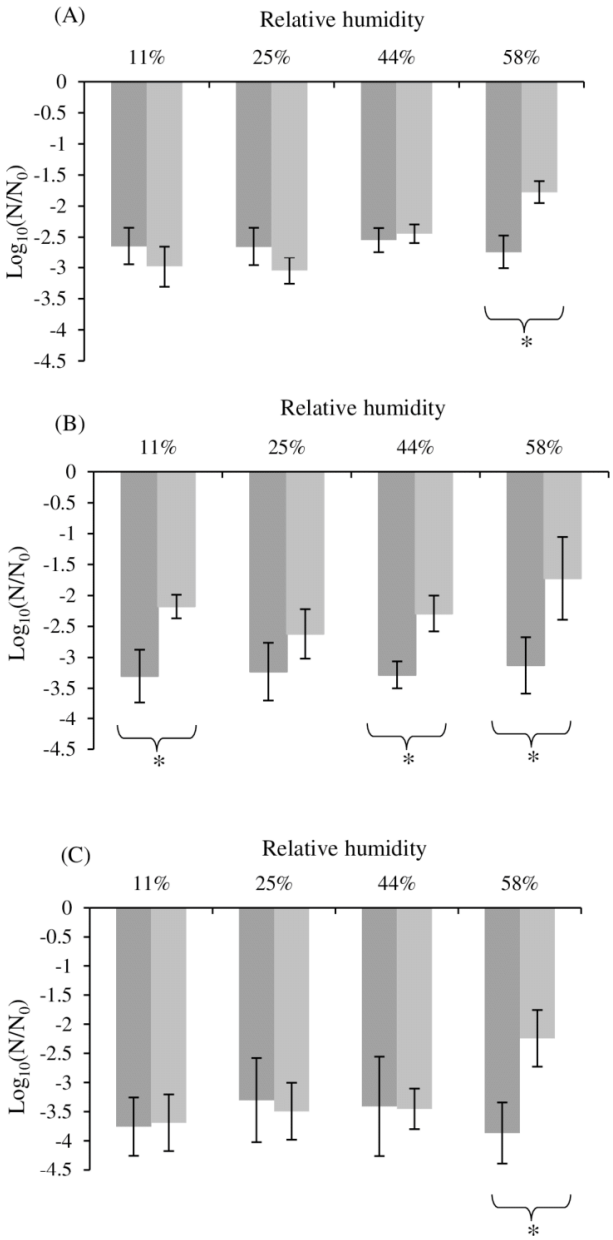

Fig 2. Impact of rehydration after drying on cultivability for *C. sakazakii* (A), S. Typhimurium (B) and *S.* Senftenberg (C). Dark grey represents the loss of cultivability obtained with instantaneous rehydration and light grey represents the loss of cultivability with rapid rehydration. Error bars represent SD calculated from triplicates and asterisks represent a significant difference between both conditions (*t*-test, $p<0.05$). The corresponding dataset was presented in S1 Table.

doi:10.1371/journal.pone.0160844.g002

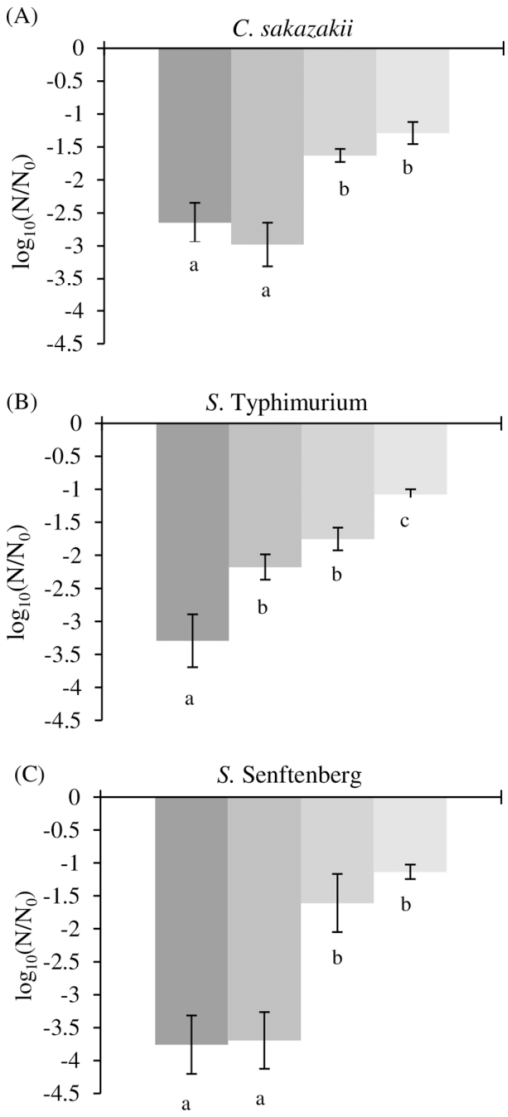

Fig 3. Comparison of four rehydration kinetics after 90 min of drying in an atmosphere at 11% RH for *C. sakazakii* (A), *S.* Typhimurium (B) and *S.* Senftenberg (C). The loss of cultivability obtained with instantaneous, rapid, slow and very slow rehydration is shown going from darker to lighter. Error bars represent SD calculated from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p<0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test. The corresponding dataset was presented in S2 Table.

doi:10.1371/journal.pone.0160844.g003

However, few studies have considered the rehydration of pathogens, such as in surface rehydration [19] or in model media [20]. In the present case, we could clearly assess the impact of rehydration on dried foodborne pathogens through the observed difference of loss of cultivability between the faster and slower rehydration modes. The slower the rehydration kinetics, the smaller the loss of cultivability was. Such a conclusion could raise two issues. The first one

concerns the rehydration performed in classical microbiological food analyses which is often similar to the instantaneous rehydration presented in this study. Indeed, the inactivation of microorganisms during this rehydration would lead to an underestimation of the pathogenic load present in the food and, therefore, to an increased risk for consumers' health. The second one concerns the different personal consumer practices in terms of dried food product rehydration which could also have important consequences on further pathogen survival in the rehydrated product.

Two phenomena occurring during the drying phase could possibly explain this significant loss of cultivability due to fast rehydration kinetics. One is the cell membrane folding followed by an intracellular vesiculation which occurs during drastic drying when water exits the cell swiftly. Plasma membrane vesiculation has already been observed and reported in previous work, both on yeasts and bacteria [9,18,20]. Indeed, this phenomenon leads to a decrease in the area of membrane. During fast rehydration, water rapidly enters the cell which tends to recover its original volume but the membrane ruptures because of its reduced surface. During the slow rehydration of cells, as used in this work, the internal vesicles would have time to reincorporate the membrane and so to prevent the cell from rupture. The other phenomenon which could be considered to explain our observations is related to osmotic solutes or active ion input in the cell during the first phase of drying [3,21,22]. This solute accumulation would involve a supplementary water input during the rehydration which leads to a greater cell volume than the initial one and so to cell rupture. Indeed, in case of instantaneous rehydration, this water input is not compensated by the simultaneous solute and ion output from the cell which have very slow rates of diffusion across the cell membrane (about 100-fold less than water) [23]. Compared to instantaneous rehydration, the rapid rehydration modes used in this study would give the cell time for these solutes or ions to exit and so to recover its initial volume after total rehydration [9]. It could be interesting to evaluate to what extent each phenomenon destroys the cells.

After drying followed by very slow rehydration, no significant differences were observed between loss of cultivability of *S*. Typhimurium, *S*. Senftenberg and *C. sakazakii*, which reached near 1 log for each species (Fig 3). Contrarily, with instantaneous rehydration, a significant difference was observed between the loss of cultivability of each specie, where *C. sakazakii* was more resistant than *S*. Typhimurium and *S*. Senftenberg. Until now, *C. sakazakii* has been known as an *Enterobacteriaceae* which is highly resistant to drying and more resistant than *Salmonella enterica* [10,22,24]. The results presented in this study suggest that the very slow rehydration mode erases the difference in loss of cultivability of the bacterial species. Consequently, it is possible to think that *C. sakazakii* is more resistant to rehydration than *S. enterica* and, consequently, not more resistant to drying by itself, maybe explaining by the different capsular properties of the strains.

Conclusions

Interestingly, the results presented in this study suggest that the impact of drying on the inactivation of pathogen is associated to rehydration kinetics. Indeed, instantaneous rehydration is responsible for the extend inactivation during the drying-rehydration process. Two hypotheses were proposed to understand the role of rehydration kinetics and it seems that appropriate management of rehydration and particularly fast rehydration could enhance the negative effects of drying/rehydration on pathogen cultivability. Rehydration is an important step when cultivability is assessed, impacting the estimation of bacterial contamination and consumer risk. In light of the above conclusions, rehydration after drying has to be normalized during routine microbial analyses in order to avoid underestimating the microbial load in dried food products. During food safety analyses, rehydration procedures need to be standardized.

Likewise, instructions for an optimal rehydration during the use of dried food have to be provided to the consumer. In the future, we suggest that rehydration has to be considered with more attention; further works would consider other foodborne pathogens and the influence of the nature of different dried food products.

Supporting Information

S1 Table. Logarithmic reduction of studied pathogens as function of instantaneous and rapid rehydration at four relative humidity levels (11%, 25%, 44% and 58% RH).
(XLSX)

S2 Table. Logarithmic reduction of studied pathogens as function of four rehydration mods (instantaneous, rapid, slow, and very slow) after drying at 11% RH for 90 min.
(XLSX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EL PG SG JMPC PAM.

Performed the experiments: EL.

Analyzed the data: EL FZ CI PG SG JMPC PAM.

Contributed reagents/materials/analysis tools: EL FZ CI.

Wrote the paper: EL FZ CI SG PAM LB JMPC PG.

References

1. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; A review. J Microbiol Methods. 2006; 66: 183–193. doi: 10.1016/j.mimet.2006.02.017 PMID: 16632005
2. Ananta E, Volkert M, Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. Int Dairy J. 2005; 15: 399–409. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.004
3. Potts M. Desiccation tolerance: A simple process? Trends Microbiol. 2001; 9: 553–559. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02231-4 PMID: 11825716
4. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol Rev. 1994; 58: 755–805. PMID: 7854254
5. Beney L, Mille Y, Gervais P. Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 65: 457–464. doi: 10.1007/s00253-004-1574-x PMID: 15095024
6. Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 96: 471–480. doi: 10.1007/s00253-012-4014-3 PMID: 22552899
7. Beney L, Simonin H, Mille Y, Gervais P. Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative *Bradyrhizobium japonicum* to hyperosmotic treatments. Arch Microbiol. 2007; 187: 387–396. doi: 10.1007/s00203-006-0203-8 PMID: 17160674
8. Billi D, Potts M. Life and death of dried prokaryotes. Res Microbiol. 2002; 153: 7–12. doi: 10.1016/S0923-2508(01)01279-7 PMID: 11881900
9. Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98: 8821–8834. doi: 10.1007/s00253-014-6028-5 PMID: 25172136
10. Beuchat LR, Komitopoulou E, Beckers H, Betts RP, Bourdichon F, Fanning S, et al. Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. J Food Prot. 2013; 76: 150–172. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-211 PMID: 23317872
11. Van Doren JM, Neil KP, Parish M, Gieraltowski L, Gould LH, Gombas KL. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973–2010. Food Microbiol. 2013; 36: 456–464. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.014 PMID: 24010629
12. Fine F, Gervais P. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: Strong influence of initial water activity. Environ Microbiol. 2005; 7: 40–46. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00689.x PMID: 15643934

13. Garbowska M, Berthold-Pluta A, Stasiak-Różańska L. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. Food Microbiol. 2015; 49: 1–5. doi: 10.1016/j.fm.2015.01.004 PMID: 25846909

14. Forsythe S. Powdered infant formula. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. The microbiological safety of low water activity foods and spices. London: Springer science+business media, LLC; 2014. pp. 177–211. doi: 10.1007/978-1-4939-2062-4

15. Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. Food Chem. 2008; 106: 1406–1416. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.076

16. Sinha RN, Shukla AK, Madan LAL, Ranganathan B. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. J Food Sci. 1982; 47: 668–669.

17. Trofimova Y, Walker G, Rapoport A. Anhydrobiosis in yeast: Influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration-rehydration. FEMS Microbiol Lett. 2010; 308: 55–61. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01989.x PMID: 20487021

18. Simonin H, Beney L, Gervais P. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. Biochim Biophys Acta—Biomembr. 2007; 1768: 1600–1610. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.03.017

19. Zoz F, Iaconelli C, Lang E, Iddir H, Guyot S, Grandvalet C, et al. Control of relative air humidity as a potential means to improve hygiene on surfaces: A preliminary approach with Listeria monocytogenes. PLoS One. 2016; 11: e0148418. doi: 10.1371/journal.pone.0148418 PMID: 26840373

20. Mille Y, Beney L, Gervais P. Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. Biotechnol Bioeng. 2003; 83: 578–582. doi: 10.1002/bit.10706 PMID: 12827699

21. Gruzdev N, Pinto R, Sela Saldinger S. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. Food Microbiol. 2012; 32: 415–422. doi: 10.1016/j.fm.2012.08.003 PMID: 22986208

22. Alvarez-Ordóñez A, Broussolle V, Colin P, Nguyen-The C, Prieto M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. Int J Food Microbiol. 2015; 213: 99–109. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004 PMID: 26116419

23. Beney L, Gervais P. Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2001; 47: 831–839.

24. Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. Int J Food Microbiol. 2009; 136: 214–220. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006 PMID: 19720413

Food Microbiology xxx (2016) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com

Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* Typhimurium in standard buffer and milk

Emilie Lang [a, b], Cyril Iaconelli [a], Fiona Zoz [a], Stéphane Guyot [a], Pablo Alvarez-Martin [b], Laurent Beney [a], Jean-Marie Perrier-Cornet [a], Patrick Gervais [a, *]

[a] UMR PAM A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté / AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France
[b] Novolyze, 50 Rue de Dijon, 21121 Daix, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 December 2015
Received in revised form 8 February 2016
Accepted 2 October 2016
Available online xxx

Keywords:
Salmonella Typhimurium
Cronobacter sakazakii
Cultivability
Milk
Drying conditions

ABSTRACT

Salmonella Typhimurium and *Cronobacter sakazakii* are two foodborne pathogens involved in neonatal infections from milk powder and infant formula. Their ability to survive in low-moisture food and during processing from the decontamination to the dried state is a major issue in food protection. In this work, we studied the effects of the drying process on *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*, with the aim of identifying the drying parameters that could promote greater inactivation of these two foodborne pathogens. These two bacteria were dried under different atmospheric relative humidities in milk and phosphate-buffered saline, and the delays in growth recovery and cultivability were followed. We found that water activity was related to microorganism resistance. *C. sakazakii* was more resistant to drying than was *S.* Typhimurium, and milk increased the cultivability and recovery of these two species. High drying rates and low final water activity levels (0.11–0.58) had a strong negative effect on the growth recovery and cultivability of these species. In conclusion, we suggest that effective use of drying processes may provide a complementary tool for food decontamination and food safety during the production of low-moisture foods.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Salmonella enterica is a Gram-negative, facultative anaerobic, motile, nonspore-forming bacterium that causes human salmonellosis. It is a major pathogen in the food industry and is highly represented in outbreaks across the world, with nearly 100,000 cases reported every year in the European Union. Because of 10^5-10^{10} cells in adults and few microorganisms in young children and elderly people (10–100 cells) cause illness, the bacterium is important in food safety and the food industry, and must be eliminated from food products (Bhunia, 2008; Gomez et al., 1997). *Cronobacter sakazakii*, another Gram-negative, facultative anaerobic, motile, and nonspore-forming bacterium, is considered an opportunistic pathogen that can cause severe infections such as meningitis, bacteremia, and necrotizing enterocolitis in infants. However, the infective dose is not well defined and the incidence of this bacterium is largely underestimated. Death rates in *Cronobacter* infections are up to 80% and *Cronobacter sakazakii* contamination is another important issue for the infant formula industry (Yan et al., 2012).

In recent years, some reported cases have involved the presence of these two pathogens in infant formula or milk powder (Beuchat et al., 2013). Milk is pasteurized and then spray-dried to provide the low water activity (a_W) of 0.35–0.25 needed to preserve the nutritional, organoleptic, and microbial qualities over time (Beuchat et al., 2013). However, milk contamination can occur during the transfer to spray-drying and during handling of dried milk (Podolak et al., 2010). This is reflected by outbreaks involving *Cronobacter* spp., such as 3 cases in 1986 in Iceland, 4 cases in 1988 in the USA, 12 cases in 1998 in Belgium, 11 cases in 2001 in the USA, 3 cases in 2004 in France, 2 cases in 2008 in USA, and 4 cases in 2011 in USA. Examples of outbreaks involving *Salmonella enterica* include 3000 cases in 1976 in Trinidad, 76 cases in 1986 in the UK, 141 cases in 2005 in France, 42 cases in 2008 in Spain, and 16 cases in 2012 in Russia. These outbreaks involved contamination of powdered infant formula or milk powder, which are low-moisture foods (Beuchat et al., 2013; CDC, 2012, 2009; Finn et al., 2013; Forsythe, 2014; Institut de veille sanitaire, 2006).

These two bacteria are found in a large range of food products and in the food industry environment (Beuchat et al., 2013; Friedemann, 2007; Iversen and Forsythe, 2004; Jaradat et al., 2009; Van Doren et al., 2013; Yan et al., 2012). a_W is a thermodynamic parameter that reflects the water availability in the environment and can affect every system involving water such as the biochemical, biological, and physiological reactions. . Bacteria have many active mechanisms, involving the activation of several resistance pathways, including sugar and amino acid accumulation, scavenger enzyme production, DNA repair, and other protein production processes, to resist dehydration caused by a change in environmental conditions, including preventing or repairing damage (Alvarez-Ordóñez et al., 2015; Billi and Potts, 2002; Deng et al., 2012; Feeney and Sleator, 2011; Gruzdev et al., 2011; Howells et al., 2002; Potts, 2001, 1994; Spector and Kenyon, 2012).

* Corresponding author.
Email address: patrick.gervais@u-bourgogne.fr (P. Gervais)

http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.005
0740-0020/© 2016 Published by Elsevier Ltd.

UNCORRECTED PROOF

Passive physical reactions take place as water exits cells during drying. The osmotic pressure increases during the first decrease in a_W through to the end of the liquid state, and oxidative stress may occur in response to the cell's exposure to an oxygen-containing atmosphere (Dupont et al., 2014). Below an a_W threshold of ~0.90, active bacterial responses no longer occur because of the low molecular mobility and bacterial metabolism (Billi and Potts, 2002; Potts, 2001, 1994). The preserved molecules needed for bacterial metabolism and cell viability may differ according to the damage caused. Thus, determining the viability by measuring cultivability may be a restrictive way to evaluate bacterial functionality after drying (Lesn et al., 2000; Spector and Kenyon, 2012).

Microorganisms are more resistant to the thermal decontamination process when in the dried state compared with the liquid state (Arroyo et al., 2012; Fine and Gervais, 2005; Laroche and Gervais, 2003; Laroche et al., 2005; Rychlik and Barrow, 2005; Skandamis et al., 2008). This particular resistance is largely attributed to the low molecular mobility (Farakos et al., 2013; Lian et al., 2015), and also to the cross-protection occurring during the transition to the dried state (Finn et al., 2013; Gruzdev et al., 2011; Shen and Fang, 2012). Inactivation of pathogens in low-a_W food is too complicated for accurate prediction because of the complex effects on cultivability (Fine et al., 2005; Finn et al., 2013). Because the drying process is involved in causing bacterial death, drying may be a potential kill step during the handling of dried products.

Because of the danger for infants and the difficulty in eliminating, in dried state, bacterial pathogens such as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*, the drying process is an important step in the control of these pathogens. From this perspective, this study aimed to understand the effects of drying parameters on these two pathogens. Three parameters were controlled: drying substrate, atmospheric relative humidity (RH), and final a_W. To observe the effects of drying on bacterial cells, cultivability after treatment was measured and the growth delay and cell recovery capacity were estimated. This provided an indirect measure of the deleterious effects on and repairable damage to the bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria species

Salmonella enterica subspecies *enteric*a serovar Typhimurium DT104 DSM 10506 and *Cronobacter sakazakii* CIP 103183T species were used. All cultures were stored in Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at −80 °C. For resuscitation, bacteria were inoculated on Tryptic Soya Agar (TSA, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 24 h and were placed for a maximum of one month at 4 °C. Five colonies of each bacterium were collected in 50 mL of TSB and incubated for 8 h at 37 °C. Suspensions were then diluted in 50 mL of new TSB to reach an optical density (OD) of 0.01 at 600 nm. Cultures in stationary growth phase were obtained after 14 h at 37 °C.

2.2. Drying conditions

2.2.1. Drying atmosphere

Hermetic boxes were used to dry the cellular suspensions. Saturated salt solutions were placed at the bottom to regulate the a_W and the atmospheric RH. Lithium chloride, potassium acetate, potassium carbonate, and sodium bromide (all from Sigma-Aldrich) were used in sufficient quantity to observed salt crystals in 100 mL of distilled water, corresponding to a height of 2 cm in the bottom of the hermetic boxes. Their respective a_W values were 0.11, 0.25, 0.44, and 0.58, which corresponded to RH values of 11%, 25%, 44%, and 58%, respectively (Greenspan, 1977). The atmosphere was maintained under convection using a ventilator (Sunon, Radiospare, France) as described in previous work (Lemetais et al., 2012). All experiments were performed at room temperature (near 25 °C).

2.2.2. Drying kinetics of PBS and milk by following the weight loss

The drying of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) and whole milk from milk powder that was rehydrated by following the manufacturer instructions (10% w/v, 26% fat, Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) was monitored by measuring the weight loss over time. The weight was measured with a precision balance (±0.0003 g) (Sartorius, Aubagne, France). The measured weight loss followed the first-order law (Eq. (1)). Using the reduction in the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), we estimated three variables: a, K, and τ. These provided a characterization of the drying rate.

$$w_t = a + Kexp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (1)$$

where w_t (g) represents the weight at time t (s), a represents the dried weight (g), K represents the initial water weight (g), and τ is the time constant (s). The initial drying rates were calculated as a derivation of w_t at $t = 0$ s.

Because only water evaporated, this loss of weight was translated into water content (grams of water per gram of dried material), and its relationship with the sorption curve of PBS or milk was used to evaluate the a_W evolution of the sample during drying. The PBS sorption curve was obtained by measuring the water content corresponding to several a_W values. The milk desorption curve was based on an equation given in a previous work (Langová et al., 2012), which allowed us to calculate the water content corresponding to each a_W value.

2.2.3. Preparation of the initial cellular suspension

Cell concentration was adjusted to 10^8 colony-forming units (CFU)/mL by measuring OD_{600} and according to calibration curves showing the link between OD_{600} and cell concentration in CFU/mL. Twenty-five-milliliter cultures were centrifuged (3400 × g, 10 min at 25 °C) and washed twice with an equal volume of PBS. The supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in 25 mL of PBS. The final bacterial number was recorded as the number of CFU by plate counting on TSA (24 h, 37 °C).

2.2.4. Drying in PBS

Droplets (10 µL containing around 10^6 bacterial cells) of bacterial suspension were spread in a small glass dish to obtain an estimated 14 µm height layer, and the dish was placed inside a box for a given time (4.5, 15, 45, 90, 180, or 840 min). After drying, the cells were rehydrated by the addition of 990 µL of PBS and homogenized by pipetting and using a cell scraper (Greiner, Les Ulis, France) permitting to suspend the initial dropped bacteria (containing around 10^6 living and dead bacterial cells).

2.2.5. Drying in milk

The cell suspension was concentrated by centrifugation to obtain a concentration of 10^9 CFU/mL. This concentrated suspension was diluted in milk to obtain a concentration of 10^8 CFU/mL. The same protocol was applied to 10 µL of contaminated milk as described above (section 2.2.4.).

UNCORRECTED PROOF

2.3. Drying effects on bacterial cells

2.3.1. Effects of drying on the loss of cultivability

After drying under different conditions and on different substrates, cells were recovered and CFU were determined by plate counting on TSA medium after 24 h at 37 °C. The result was compared with the initial bacterial concentration and expressed as log (N/N_0), where N represents the CFU of stressed bacteria and N_0 represents the CFU of the initial bacterial suspension.

2.3.2. Effects on growth recovery capacity

2.3.2.1. Growth curves of dehydrated–rehydrated bacteria

The bacterial growth kinetics before and after the drying process were assessed and compared for *Salmonella* Typhimurium and *Cronobacter sakazakii*. A 0.5 mL aliquot of the bacterial suspension at a concentration of 10^2 CFU/mL of cultivable cells was transferred to 9.5 mL of TBS and incubated at 37 °C. The OD_{600} was measured every hour for 20 h.

2.3.2.2. Calculation of the delay in growth recovery

To determine the growth delay induced strictly by the drying process, an adjustment of the measured points of bacterial growth to a sigmoid curve was performed (Iaconelli et al., 2015) (Eq. (2)). Using the reduction in the sum of squares scores between the experimental curve and the model (*fminsearch* function in Matlab R2012a), three representative variables of the growth kinetics were calculated: OD_{max}, b, and r.

$$OD_t = \frac{OD_{max}}{(1 + bexp(-rt))} \quad (2)$$

where OD_t represents the OD at time t (h), OD_{max} represents the OD of the stationary growth phase, and b and r (h^{-1}) are constants.

μ_{max} and the inflexion point (t_{Inflex}) were then calculated as shown in Eqs. (3) and (4), respectively.

$$\mu_{max} = \max\left(OD'_t\right) \quad (3)$$

$$t_{Inflex} = \frac{\ln(|a|)}{r} \quad (4)$$

where μ_{max} (h^{-1}) represents the maximum growth rate, and t_{Inflex} (h) represents the inflexion time of the growth curves.

The time to detect bacterial population was estimated as the time corresponding to the intersection between the tangent to the inflexion point, which had μ_{max} as the slope, and the abscissa axis.

Finally, to compare the previously calculated time to detect bacterial population for each bacterial species and each treatment, the time delay of growth recovery was normalized as shown in Eq. (5):

$$t_{delay} = t_{d(D)} - t_{d(C)} \quad (5)$$

where t_{delay} (h) is the resulting calculated time delay of growth recovery, $t_{d(D)}$ (h) is the time to detect bacterial population calculated from the growth curve for dried bacteria, and $t_{d(C)}$ (h) is the time to detect bacterial population calculated from the growth curve for fresh culture. Because we designed this experiment for cultivable cells, we used this method to estimate the repairable damage.

2.4. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. To compare the results obtained in this study, the variance homogeneity (F-test) was tested and then, if $P > 0.05$, an ANOVA or *t*-test was applied using R software (R Development Core Team, 2008). In the case of significant ANOVA, a Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test was performed to observe significant difference among conditions.

3. Results

Our study focused on the effects of drying on *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability and growth recovery capacity. Our results are presented in three parts: loss of bacterial cultivability as a function of drying time, loss of bacterial cultivability as a function of a_W evolution, and delay in bacterial growth recovery as a function of the initial drying rate and final a_W.

3.1. Evolution of the loss of S. Typhimurium and C. sakazakii cultivability as a function of drying time

3.1.1. Drying in PBS

The loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during drying was assessed at different atmospheric RHs (11%, 25%, 44%, and 58% RH) and over time (4.5, 15, 45, 90, 180, and 840 min) in PBS. A significant difference was observed in the loss of bacterial cultivability, with significant effects of time and species (ANOVA, $P < 0.05$). The loss of cultivability always decreased during drying (Fig. 1). This decrease was nonlinear for both species for all conditions, and two phases were observed.

The first phase of loss of cultivability decrease was sharp, as observed between 0 and 45 min at all atmospheric RHs for *S.* Typhimurium and *C. sakazakii*. For *S.* Typhimurium, this decrease represented −3.2 log at 11%, −3.0 log at 25%, −3.3 log at 44%, and −2.7 log at 58% RH. For *C. sakazakii*, this decreased represented −1.6 log at 11%, −2.2 log at 25%, −2.3 log at 44%, and −1.9 log at 58% RH.

The second phase corresponded to a slow decrease and stabilization of the loss of cultivability (Fig. 1), and occurred between 45 min and the end of the treatment. For *S.* Typhimurium, stabilization was observed near −3.9 log at 11%, −4.0 log at 25%, −4.0 log at 44%, and −4.0 log at 58% RH. For *C. sakazakii*, stabilization was observed near −2.7 log at 11%, −3.0 log at 25%, −3.0 log at 44%, and −2.6 log at 58% RH. In general, *C. sakazakii* was less sensitive to drying than *S.* Typhimurium, and the difference was 1.0 log for all drying conditions.

These results indicate that the decrease in the loss of cultivability during drying versus time was substantial and nonlinear.

3.1.2. Drying in milk

The loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during milk drying was assessed in the same conditions as in the experiments using PBS. A significant difference was observed in bacteria cultivability, with a significant effect of time (ANOVA, $P < 0.05$). No effect of species was detected, and this decrease was nonlinear for both species in all conditions. As in the drying in PBS, two phases were observed (Fig. 1).

The first phase of cultivability decrease was sharp and was observed between 0 and 45 min at all atmospheric RHs for both bacterial species. For *S.* Typhimurium, this decrease represented −1.0 log at

UNCORRECTED PROOF

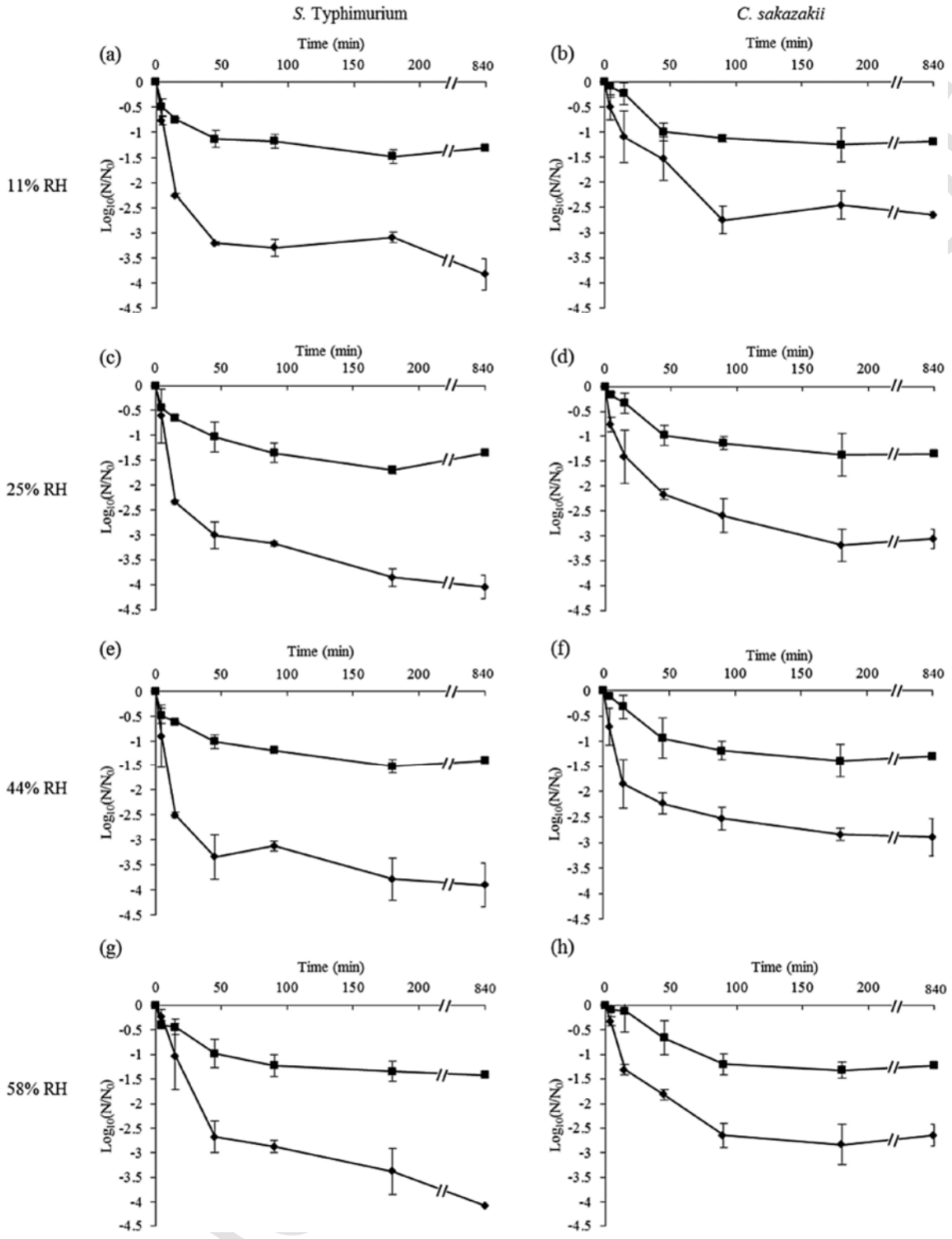

Fig. 1. Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability as a function of drying time in four atmospheres. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL, and the method detection limit was about −4.5 log. Squares and diamonds represent the results in milk and PBS, respectively. (a) *S.* Typhimurium dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S.* Typhimurium dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S.* Typhimurium dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S.* Typhimurium dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% relative humidity. Error bars represent standard deviations obtained from triplicates.

all RHs, excepted at 11% RH where decrease represented −1.1 log. For *C. sakazakii*, the loss of cultivability represented −1.0 log at 11% and 25%, −0.9 log at 44%, and −0.7 log at 58% RH. The second phase was a slow decrease and stabilization of cultivability, which occurred between 45 min and the end of drying. For *S.* Typhimurium, stabilization near −1.3 log at all RHs was observed. For *C. sakazakii*, stabilization occurred near −1.2 log at 11%, −1.4 log at 25%, −1.4 log at 44% and −1.3 log at 58% RH. The two phases of the loss of *C. sakazakii* and *S.* Typhimurium cultivability exhibited the same behavior as observed for drying.

We compared the effects of milk and PBS (Fig. 1) to examine the effect of the substrate on drying efficiency. ANOVA showed a highly significant ($P < 0.001$) effect of the drying substrate on cultivability for both species. Cultivability of both species was always higher in

milk than in PBS. For both media, the loss of cultivability was nonlinear. Contrary to PBS, treatment in milk did not exhibit a species effect during drying.

3.2. Evolution of the loss of S. Typhimurium and C. sakazakii cultivability as function of the a_W evolution

The nonlinearity observed for all drying conditions presented in Fig. 1 showed that time could not explain the decrease in cultivability for both species and for both substrates. To relate the loss of pathogen cultivability to the a_W evolution during drying, the drying kinetics were examined under the different conditions by following the loss of water weight at 58%, 44%, 25%, and 11% RH over time. The time constants of water loss systems τ and the initial drying rates were calculated as a first-order system for each condition to provide information about the drying kinetics (Table 1). Water content was determined from the weight loss at each time of measurement. Using the milk and PBS sorption curves (Fig. 2) reported from previous work (Langová et al., 2012) and established in this study, respectively, we expressed the loss of cultivability as a function of the a_W evolution during drying (Fig. 3).

Table 1
Calculated time constants for weight loss τ and the initial drying rates for the loss of water weight (mg.min^{-1}) for each drying condition for PBS and milk substrates.

Atmospheric RH	PBS		Milk	
	τ (min)	Initial rate (mg min^{-1})	τ (min)	Initial rate (mg min^{-1})
11%	3.0 (±0.08)^{ab}	−3.00 (±0.12)^{ab}	1.8 (±0.27)^{b}	−5.46 (±1.32)^{b}
25%	4.2 (±0.69)^{ab}	−2.82 (±1.02)^{ab}	3.7 (±0.94)^{ab}	−3.06 (±1.20)^{ab}
44%	5.0 (±0.15)^{ab}	−2.58 (±0.30)^{a}	4.7 (±0.95)^{ab}	−2.04 (±0.54)^{a}
58%	5.6 (±0.17)^{a}	−1.80 (±0.06)^{a}	5.2 (±0.95)^{a}	−1.98 (±0.72)^{a}

Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates.
The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test, independently for τ and for initial rates.

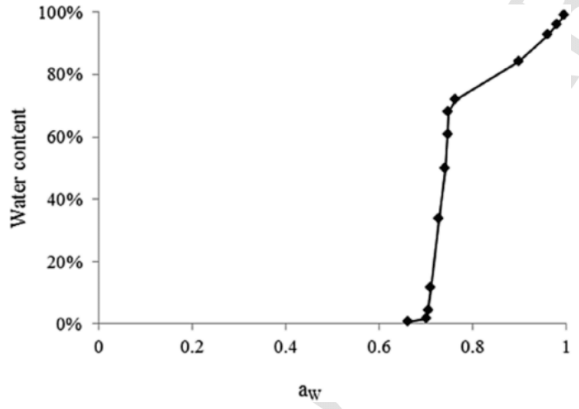

Fig. 2. Sorption curves of PBS at 20 °C expressed with water content as function of a_W.

3.2.1. Evolution of the loss of PBS and milk weights during drying

In the classical modeling of the weight loss during drying as a first-order system (Eq. (1)), the weight loss for time τ (min) (Table 1) and time 5τ (min) represents 63% and 99% of the total weight loss, respectively. ANOVA showed that these τ values differed significantly ($P < 0.05$) as function of the atmospheric RH and the drying substrate. Using this model, in the PBS condition, 28.1, 25.2, 21.1, and 15.1 min were required to lose 99% (corresponding to 5τ) of the maximum weight loss at 58%, 44%, 25%, and 11% RH, respectively. In this analysis, 58% RH provided the slowest rate and 11% RH the fastest rate. Similarly, 25.8, 23.3, 18.3, and 9.0 min were required to lose 99% of the maximum loss of milk weight at 58%, 44%, 25%, and 11% RH, respectively. Similar observations were made for the initial rate of drying (Table 1).

As τ and the initial drying rates decreased with the increasing drying atmospheric RH, the loss of cultivability could be expressed as function of the a_W evolution of the substrate.

3.2.2. Loss of S. Typhimurium and C. sakazakii cultivability as function of the corresponding substrate a_W level

As previously described, milk and PBS desorption curves (Fig. 2) and a_W evolution differed substantially. For instance, to reduce from an a_W of 0.99 to 0.80, the water content decreased from 99% to 78%. In milk, for the same a_W change, the water content decreased from 99% to 20%. Consequently, we have expressed the loss of cultivability as a function of a_W, as shown in Fig. 3.

For drying in PBS, three phases were observed for all conditions and in both species. The first phase of the decrease in cultivability was observed between an a_W of 0.99 and 0.90 at all atmospheric RHs for both species. When comparing the different RH atmospheres of drying for *S.* Typhimurium, the loss of cultivability for drying at 0.90 a_W was estimated as −1.4 log at 11%, 24%, and 58% RH and at −2.5 log at 44% RH. For *C. sakazakii*, at the same drying level, the values were estimated as −0.8 log, −1.2 log, −2.0 log, and −1.5 at 11%, 25%, 44%, and 58% RH, respectively. These results suggest that the initial drying rate was substantial and that the rate corresponding to 44% RH was the more deleterious for the cultivability of both species. The second phase was a slow linear decrease, which represented a smaller loss of cultivability. We found that the change in cultivability as a function of a_W was more linear than as a function of time in PBS for the smallest a_W (0.11 and 0.25). For drying in milk, the same assessment can be done for both bacteria. When expressing the loss of cultivability as a function of a_W, at the end of drying, the loss of cultivability remained greater in milk than in PBS. The third phase corresponded to a stationary phase in which a_W was constant (last point in Fig. 3).

3.3. Effects of drying on growth recovery capacity of cultivable cells

Growth curves of both species before and after different drying levels in milk and in PBS were obtained by following the OD_{600}, after rehydration and inoculation in TSB. This allowed us to evaluate the effects of different drying conditions on bacterial cells by comparing the times to detect bacterial population for dehydrated–rehydrated bacterial cells. The supplementary time to detect bacterial population, as an estimate of growth recovery capacity, was estimated for all atmospheric RHs of drying. We evaluated the effects of the initial drying rate to reach an a_W of 0.90 (Table 2) and of the final a_W (Table 3) on the delay in growth recovery at the same cultivable bacterial concentration. This provided an estimation of the reversible injury caused by drying. It should be noted that we reported results obtained in all

UNCORRECTED PROOF

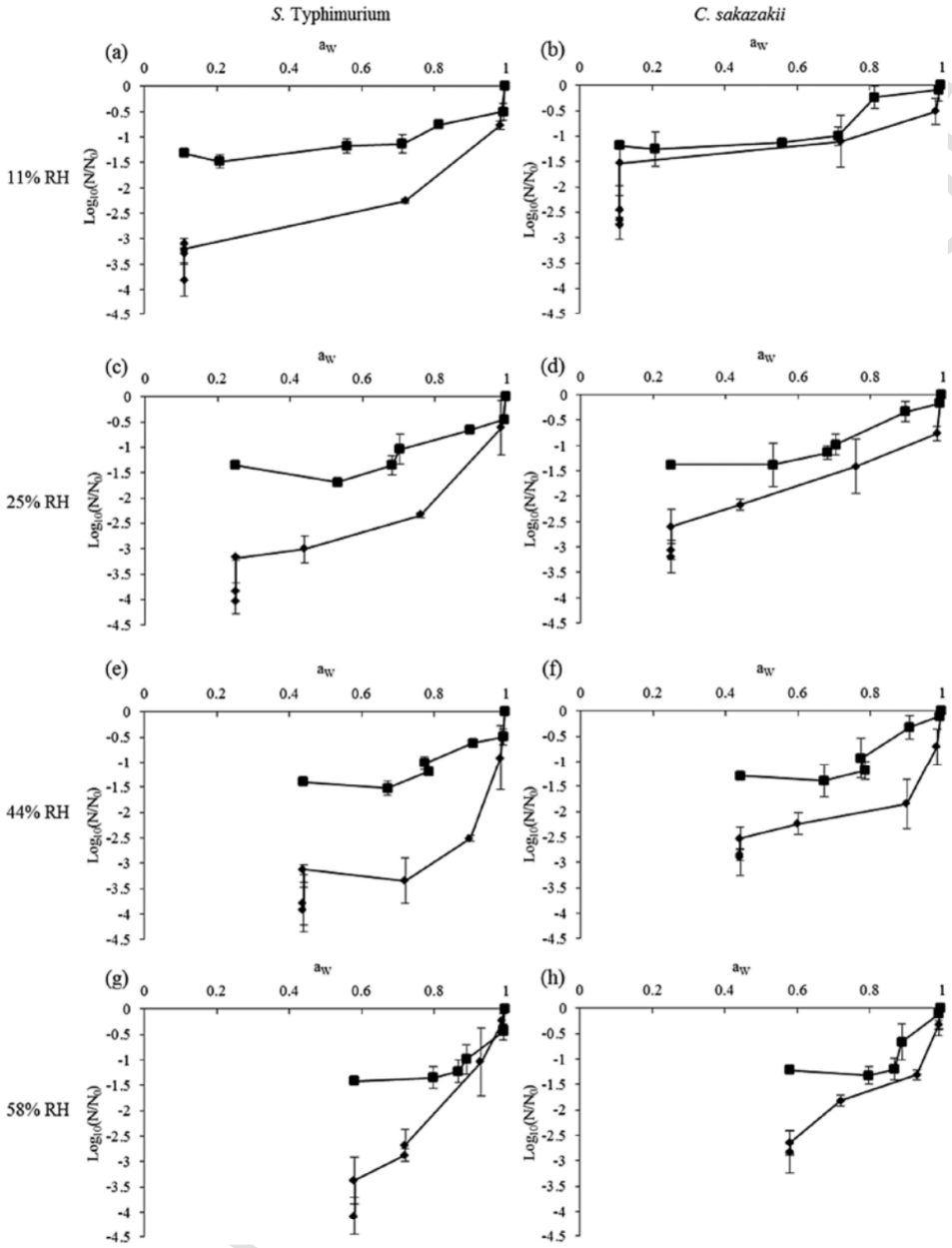

Fig. 3. Loss of *S.* Typhimurium and *C. sakazakii* cultivability during drying in air equilibrated at four relative humidity (RH) levels as a function of the calculated suspension a_W. The initial bacterial concentration was 10^8 CFU/mL and the method detection limit was about −4.5 log. Squares: drying in milk; diamonds: drying in PBS. (a) *S.* Typhimurium dried at 11% RH; (b) *C. sakazakii* dried at 11% RH; (c) *S.* Typhimurium dried at 25% RH; (d) *C. sakazakii* dried at 25% RH; (e) *S.* Typhimurium dried at 44% RH; (f) *C. sakazakii* dried at 44% RH; (g) *S.* Typhimurium dried at 58% RH; (h) *C. sakazakii* dried at 58% RH. Error bars represent SDs obtained from triplicates.

conditions to the control and then compared among them. Statistical analyses were performed to determine whether the tested conditions differed significantly from the control.

3.3.1. Effects of the initial drying kinetics

For all drying conditions corresponding to 11%, 25%, 44%, and 58% RH, the supplementary times to detect bacterial population after drying until an a_W of 0.90 are shown in Table 2. In the first part of drying, the decreases in cultivability were severe for each species (Fig.

Table 2
Comparison of supplementary time to detect bacterial population of species desiccated in PBS and milk submitted to different initial drying rates to reach an a_W of 0.90.[1]

Species	Substrate	Supplementary time to detect bacterial population obtained after drying at different initial drying rates to reach an a_W of 0.90			
		Rate 1[2]	Rate 2[3]	Rate 3[4]	Rate 4[5]
S. Typhimurium	PBS	+1.6 h ($\pm$0.6)^{ab}	+0.9 h ($\pm$0.4)^{bc}	+0.1 h ($\pm$0.5)^{c}	+0.2 h ($\pm$0.2)^{c}
	Milk	+0.3 h ($\pm$0.1)^{c}	+0.2 h ($\pm$0.1)^{c}	+0.4 h ($\pm$0.3)^{c}	+0.2 h ($\pm$0.4)^{c}
C. sakazakii	PBS	+3.0 h ($\pm$0.5)^{a}	+1.5 h ($\pm$0.4)^{abc}	+1.2 h ($\pm$0.7)^{bc}	+0.3 h ($\pm$0.4)^{c}
	Milk	+0.2 h ($\pm$0.5)^{c}	+0.1 h ($\pm$0.1)^{c}	+0.2 h ($\pm$0.3)^{c}	+0.1 h ($\pm$0.6)^{c}

Rehydration was performed in PBS and, after, cells were inoculated in TSB and incubated at 37 °C. The supplementary time to detect bacterial population is an expression of the difference between desiccated bacteria and undesiccated bacteria. Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test.
1. Obtained with different atmospheres.
2. Initial drying rate corresponding to drying at 11% RH.
3. Initial drying rate corresponding to drying at 25% RH.
4. Initial drying rate corresponding to drying at 44% RH.
5. Initial drying rate corresponding to drying at 58% RH.

Table 3
Comparison of supplementary time to detect bacterial population for bacteria desiccated in PBS and milk submitted to drying to reach different final a_W levels.

Species	Substrate	Supplementary time to detect bacterial population after drying at different final a_W			
		0.11[1]	0.25[2]	0.44[3]	0.58[4]
S. Typhimurium	PBS	+1.1 h ($\pm$0.9)^{ab}	+1.7 h ($\pm$0.7)^{ab}	+1.4 h ($\pm$1.1)^{ab}	+0.6 h ($\pm$0.9)^{b}
	Milk	+0.2 h ($\pm$0.3)^{b}	+0.1 h ($\pm$0.1)^{b}	+0.9 h ($\pm$0.1)^{b}	+0.3 h ($\pm$0.3)^{b}
C. sakazakii	PBS	+2.7 h ($\pm$0.5)^{ab}	+2.6 h ($\pm$0.8)^{ab}	+2.9 h ($\pm$1.1)^{a}	+1.1 h ($\pm$0.4)^{ab}
	Milk	+0.2 h ($\pm$0.1)^{b}	+0.3 h ($\pm$0.1)^{b}	+0.1 h ($\pm$0.2)^{b}	+0.1 h ($\pm$0.5)^{b}

Rehydration was performed in PBS and, after, cells were inoculated in TSB and incubated at 37 °C. The supplementary time to detect bacterial population is an expression of the difference between desiccated bacteria and undesiccated bacteria. Numbers in parentheses are the standard deviations obtained from independent triplicates. The letters represent a significant difference ($p < 0.05$) obtained with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test.
1. Represents the final a_W obtained through drying at 11% RH.
2. Represents the final a_W obtained through drying at 25% RH.
3. Represents the final a_W obtained through drying at 44% RH.
4. Represents the final a_W obtained through drying at 58% RH.

3). These results allowed us to compare the effects of the initial drying rate on the capacity of the bacteria to repair the injuries and to regrow.

The initial drying rates for each condition were previously calculated in milligrams of water per minute, and are expressed in a_W units per minute through the translation of water weight in a_W using the sorption curves (Table 1). To extend this analysis to drying in PBS and milk, the initial drying rate at 11% RH was called rate 1 and corresponded to -29.9×10^{-4} and -7.30×10^{-4} a_W units per minute for PBS and milk, respectively. Similarly, 25% RH was called rate 2 and corresponded to -26.1×10^{-4} and -7.28×10^{-4} a_W units per minute, 44% RH was called rate 3 and corresponded to -25.2×10^{-4} and -7.27×10^{-4} a_W units per minute, and 58% RH was called rate 4 and corresponded to -11.2×10^{-4} and -7.26×10^{-4} a_W units per minute, respectively. The initial drying rate was substantially influenced by the drying substrate, and the drying kinetics of PBS was faster than the drying kinetics of milk.

In the control, no supplementary times to detect bacterial population were observed in milk, but some differences were observed in PBS. For *S.* Typhimurium, significant differences (*t*-test, $P < 0.05$) from the control were observed for the initial rates 1 (11% RH) and 2 (25% RH) and corresponded to +1.6 h and +0.9 h of supplementary time to detect bacterial population. As shown in Fig. 3, to reach an a_W of 0.90, the most damaging condition was initial rate 3 (44% RH). For *C. sakazakii*, initial rates 1, 2, and 3 showed significant differences (*t*-test, $P < 0.05$) in growth recovery capacity from the control: +3.0 h, +1.5 h, and +1.2 h of delay.

3.3.2. Effects of the final drying level

The supplementary times to detect bacterial population after drying at the final a_W values of 0.11, 0.25, 0.44, and 0.58 are shown in Table 3. The final a_W represents the equilibrium a_W for each drying condition. These results permitted us to compare the effects of the final a_W of drying on the capacity of bacteria to repair damage.

Regarding all drying final a_W values, supplementary times to detect bacterial population were observed in PBS but not in milk. Comparison of these supplementary delays (Table 3) in growth recovery with the supplementary delays in growth recovery obtained after drying to an a_W of 0.90 for both species (Table 2) showed no differences at 11% RH but differences for other atmospheric RHs. The increases in pathogen delay recovery were greater during the first step of drying, which reached an a_W of 0.90, than during the following step to reach the final a_W. For example, for *C. sakazakii*, the increase in delay was about +1.2 h for the first 0.10 a_W decrease (to reach 0.90) and about +1.7 h for the last 0.46 a_W decrease (to reach 0.44). Consequently, the increase in delay of growth recovery was not proportional to the decrease in a_W.

Also, milk and PBS had different effects on the supplementary time to detect bacterial population.

4. Discussion

In this study, we used several approaches to evaluate the effects of drying conditions on *S.* Typhimurium and *C. sakazakii*. Cultivability was used as an estimate of viability and deleterious damage, and growth recovery capacity was used to evaluate the injury to cultivable cells. The main reason for this approach was to determine whether the substrate a_W could explain the loss of pathogen cultivability as a function of the a_W evolution during drying. Table 4 summarizes the effects of drying on both species.

For the two substrates tested, the first cultivability decrease and delay in recovery were compared. Upon reaching an a_W of 0.90 in PBS, the cultivability of *S.* Typhimurium decreased suddenly and reversible damage occurred at the lowest RH conditions (25% and 11% RH) of drying (Table 4). This shows the initial drying kinetics. At the beginning of drying (until an a_W of 0.90), evaporation of water causes an increase in osmotic pressure and solute concentration in the extracellular medium and a large cellular water outflow from the cells; the kinetics of these processes affects the cells (Potts, 2001). For both substrates, the desiccation stress provokes an osmotic stress due to the loss of intracellular water increasing solute or ion concentrations in the cell. In PBS, this osmotic stress is due to an increase in salt concentration. Even if the bacteria could adapt, damage caused by this

UNCORRECTED PROOF

Table 4
Effects of drying on the loss of cultivability and delay in growth recovery for both species in two substrates.

Species	Substrate	Loss of cultivability								Delay of growth recovery							
		Initial drying rate[a]				From 0.90 to final drying level[b]				Initial drying rate[a]				From 0.90 to final drying level[b]			
		Rate 1	Rate 2	Rate 3	Rate 4	0.11[c]	0.25[d]	0.44[e]	0.58[f]	Rate 1	Rate 2	Rate 3	Rate 4	0.11[c]	0.25[d]	0.44[e]	0.58[f]
S. Typhimurium	PBS	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	++	+	–	–	–	+	+	–
	Milk	+	+	+	++	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
C. sakazakii	PBS	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	+++	++	+	–	–	+	++	+
	Milk	+	+	+	++	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–

– and + refer to the effects of drying on the loss of cultivability and the delay in growth recovery related to the two phases of drying in different conditions.

[a] To reach an a_W of 0.90 in the different atmospheric RHs, see Table 2.

[b] From 0.90 to the final drying level (0.11, 0.25, 0.44, and 0.58) in different atmospheric RH.

[c] Represented the final a_W obtained through drying at 11% RH.

[d] Represented the final a_W obtained through drying at 25% RH.

[e] Represented the final a_W obtained through drying at 44% RH.

[f] Represented the final a_W obtained through drying at 58% RH.

stress affects macromolecules and membranes (Beney et al., 2004; Lemetais et al., 2012; Potts, 2001). These modifications can be irreversible and may decrease cultivability. However, they can also be reversible but require repair mechanisms before the cells can develop and grow, which would explain the supplementary time to detect bacterial population observed in this study caused by the presence of injured cells (Xu et al., 2015; Zhou et al., 2011). In terms of the cultivability of *S.* Typhimurium, the effects of the kinetics were more deleterious at 44% and 58% than at 25% and 11% RH (Table 1), and the supplementary delay of growth recovery occurred earlier for the faster kinetics (at 11% and 25% RH) than for the slower kinetics (at 44% and 58% RH) in PBS (Table 4). Nevertheless, if growth recovery delay does not increase as the cultivability decreases, the damage occurring during drying can be deleterious or irreversible. Damage induced by exposure to air at 44% and 58% RH was irreversible; in contrast, at 25% and 11% RH the damage was reversible (Table 4). *C. sakazakii* is known to be more resistant than *S.* Typhimurium (Dancer et al., 2009; Osaili and Forsythe, 2009), which we also found in our study of cultivability in PBS (Table 4).

Taken together, the available information suggests that, depending on the substrate, the choice of the initial drying rate is crucial for inducing a maximum first cultivability decrease and causing irreversible damage to pathogenic cells.

For all drying conditions, loss of cultivability became slower after 45min or after reaching an a_W of 0.90 in PBS. After the first loss of water and around an a_W of 0.90, cells began to be exposed to the atmosphere. The water removal in extracellular and intracellular media generates reactive oxygen species in cells and the accumulation of free radicals (Potts, 2001, 1994), which can promote structural protein modifications, damage to cellular molecule aggregations, and membrane lipid bilayer disruption (Beney et al., 2007; Billi and Potts, 2002; Dupont et al., 2010; Lemetais et al., 2012). For *S.* Typhimurium, the growth recovery capacity was affected at a final a_W of 0.11, 0.25, and 0.44 but not at 0.58 (Table 4). This suggests that the oxidation during drying depends on the a_W range. This has been shown for lipid oxidation, which depends on the a_W and is maximal at 0.60, decreases to 0.40, and increases again to 0.10 at a lower level than at 0.60 (Karel, 1980).

In both drying levels at 11% RH in PBS, to reach a_W levels of 0.90 and 0.11 (Table 4), no differences were observed between species for the delay in growth recovery, but differences were observed for cultivability. Subsequently, modifications caused by the slow phase of drying may have generated such irreversible damage. In an extreme drying such as drying to an a_W of 0.11, the water removal can affect protein structure irreversibly, as shown by Leslie et al. (Leslie et al., 1995) who found a correlation between the loss of cultivability and protein denaturation during drying. Protein denaturation can also affect the integrity of the plasma membrane, which comprises proteins and lipids (Lemetais et al., 2012). In the same way, with the decrease from an a_W of 0.90 to 0.44, injury occurred at 44% RH for *S.* Typhimurium, and this was accompanied by a very slow decrease in cultivability.

Our findings indicate that the final a_W after drying is an important parameter in determining the extent of irreversible damage and, at the same, the kinetics used to cross an oxidative a_W range can promote the loss of bacterial cultivability *in situ*.

In addition, as shown at final water activity for all drying in PBS, a decrease in cultivability occurred during maintaining at 0.11, 0.25, 0.44 or 0.58. This information is in accordance with the literature; the storage at low water activity is known to be deleterious for bacterial cells (Himathongkham et al., 1999; Lin and Beuchat, 2007).

In our study, the cultivabilities of both bacteria were preserved during drying in milk compared with drying in PBS, which shows a strong protective effect of milk (Fig. 2). This may be explained by the difference between the PBS and milk desorption curves. The PBS desorption curve has a sigmoid form with a large decrease in a_W for a small loss of water content until an a_W of 0.72, which is the saturation a_W of PBS. Unlike PBS, the milk desorption curve presents as a tangential form with a slow decrease in a_W for a large loss of water content until an a_W of 0.80 (Fig. 2). Milk is used for bacterial protection in freeze-drying and spray-drying processes because of its glassy properties and its composition (Morgan et al., 2006; Pehkonen et al., 2008). Disaccharides at high concentrations are protective against drying and freeze-drying, and lactose has a protective effect on cultivability in lactic acid bacteria (Shrestha et al., 2007). Milk also comprises proteins and phospholipids, and these two components may provide supplementary targets for oxidation, which might reduce the extracellular oxidative effects on these cells. These properties of milk may explain the preservation of both bacteria species during drying (Shrestha et al., 2007). Additionally, loss of cultivability was less important in milk than in PBS, and the surviving cells did not display any reversible damage when dried in milk and displayed only minor reversible damage when dried in PBS (Table 4). This suggests the existence of different subpopulations with different sensitivities to drying (Lianou and Koutsoumanis, 2013, 2011; Zhou et al., 2011).

Considering that milk erased the bacterial species effect, we suggest that the drying substrate, and more precisely the pathogen–substrate pairing, is a major parameter implicated in the loss of bacterial cultivability during drying.

UNCORRECTED PROOF

5. Conclusion

Different drying parameters (kinetics, atmospheric RH, bacterial species, and food substrates) affected the loss of bacteria cultivability. The growth recovery capacity was critically influenced by the first step of drying, which represented the first loss of water to an a_W of about 0.90 and involved osmotic stress. As the drying rate increased, the loss of cultivability and the extent of repairable damage decreased. Bacterial cultivability and growth recovery were also influenced by the second phase of drying but to a lesser extent, which could be related to an oxidative stress mainly due to the prolonged contact between air and cells. Our results indicate that the drying conditions are important for cell resistance and can be controlled to maximize the death of pathogens. The a_W seems provide information for the monitoring and control of pathogenic microorganisms during drying. If used appropriately, drying may provide a complementary tool to ensure food safety. However, further research is needed before developing applications. The effects of drying parameters on bacterial viability should be studied in other pathogens, for different food substrates, and in association with various decontamination processes. Further testing in industrial conditions is also needed.

Acknowledgement

This work was supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (France, grant number: 2012/1631) and Novolyze (France), which are gratefully acknowledged.

References

Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., Prieto, M., 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. Int. J. Food Microbiol. 213, 99–109. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004.

Arroyo, C., Cebrián, G., Condón, S., Pagán, R., 2012. Development of resistance in Cronobacter sakazakii ATCC 29544 to thermal and nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions. J. Appl. Microbiol. 112, 561–570. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05218.x.

Beney, L., Mille, Y., Gervais, P., 2004. Death of Escherichia coli during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, 457–464. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1574-x.

Beney, L., Simonin, H., Mille, Y., Gervais, P., 2007. Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative Bradyrhizobium japonicum to hyperosmotic treatments. Arch. Microbiol. 187, 387–396. http://dx.doi.org/10.1007/s00203-006-0203-8.

Beuchat, L.R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R.P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten, H.M., Ter Kuile, B.H., 2013. Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. J. Food Prot. 76, 150–172. http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211.

Bhunia, A.K., 2008. Salmonella enterica. In: Heldman, D.R. (Ed.), Foodborne Microbial Pathogens. Springer science+business media, LLC, New-York, pp. 201–216.

Billi, D., Potts, M., 2002. Life and death of dried prokaryotes. Res. Microbiol. 153, 7–12. http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01279-7.

CDC, 2012. CDC Update: Investigation of Cronobacter Infections Among Infants in the United States. [WWW Document]. URL http://www.cdc.gov/cronobacter/investigation.html (Accessed 1 April 2016).

CDC, 2009. Cronobacter Species Isolation in Two Infants - New Mexico, 2008. [WWW Document]. URL http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5842a3.htm (Accessed 1 April 2016).

Dancer, G.I., Mah, J.H., Rhee, M.S., Hwang, I.G., Kang, D.H., 2009. Resistance of Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) to environmental stresses. J. Appl. Microbiol. 107, 1606–1614. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04347.x.

Deng, X., Li, Z., Zhang, W., 2012. Transcriptome sequencing of Salmonella enterica serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. Food Microbiol. 30, 311–315. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.001.

Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.F., Lherminier, J., Gervais, P., 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1798, 975–985. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.015.

Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., Beney, L., 2014. Survival kit of Saccharomyces cerevisiae for anhydrobiosis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 8821–8834. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5.

Farakos, S.M.S., Frank, J.F., Schaffner, D.W., 2013. Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of Salmonella in low-moisture foods. Int. J. Food Microbiol. 166, 280–293. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.007.

Feeney, A., Sleator, R.D., 2011. An in silico analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen Cronobacter sakazakii. Bioeng. Bugs 2, 260–270. http://dx.doi.org/10.4161/bbug.2.5.17238.

Fine, F., Ferret, E., Gervais, P., 2005. Thermal properties and granulometry of dried powders strongly influence the effectiveness of heat treatment for microbial destruction. J. Food Prot. 68, 1041–1046.

Fine, F., Gervais, P., 2005. Thermal destruction of dried vegetative yeast cells and dried bacterial spores in a convective hot air flow: strong influence of initial water activity. Environ. Microbiol. 7, 40–46. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00689.x.

Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., Fanning, S., 2013. Mechanisms of survival, responses, and sources of Salmonella in low-moisture environments. Front. Microbiol. 4, 1–15. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331.

Forsythe, S., 2014. Powdered infant formula. In: Gurtler, J.B., Doyle, M.P., Kornacki, J.L. (Eds.), The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices. Springer, London, pp. 177–211. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4.

Friedemann, M., 2007. Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. 116, 1–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018.

Gomez, T.M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Käferstein, F.K., Stöhr, K., 1997. Foodborne salmonellosis. Lancet 50, 81–89. http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(90)92844-8.

Greenspan, L., 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. Res. Natl. Bur. Stand. A- Phys. Chem. 81A, 89–96.

Gruzdev, N., Pinto, R., Sela, S., 2011. Effect of desiccation on tolerance of Salmonella enterica to multiple stresses. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1667–1673. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02156-10.

Himathongkham, S., Nuanualsuwan, S., Riemann, H., 1999. Survival of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in chicken manure at different levels of water activity. FEMS Microbiol. Lett. 172, 159–163. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00033-6.

Howells, A.M., Bullifent, H.L., Dhaliwal, K., Griffin, K., García de Castro, A., Frith, G., Tunnacliffe, A., Titball, R.W., 2002. Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Res. Microbiol. 153, 281–287. http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01321-9.

Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, L.G., Langella, P., Gervais, P., Beney, L., 2015. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. J. Biotechnol. 214, 17–26. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.022.

Institut de veille sanitaire, 2006. Infections à Enterobacter sakazakii associées à la consommation d'une préparation en poudre pour nourrissons. [WWW Document]. URL http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=4937 (Accessed 12 July 2015).

Iversen, C., Forsythe, S., 2004. Isolation of Enterobacter sakazakii and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol. 21, 771–777. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.009.

Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A., Rashdan, A.M., 2009. Isolation of Cronobacter spp. (formerly Enterobacter sakazakii) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequ. BMC Microbiol. 9, 225–236. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-225.

Karel, M., 1980. Lipid oxidation, secondary reactions and water activity of foods. In: Simic, M.G., Karel, M. (Eds.), Autoxidation in Food and Biological Systems. Springer Science+Business Media, LLC, pp. 191–206.

Langová, J., Štencl, J., Vlášek, V., 2012. Water sorption isotherms of skimmed milk powder within the temperature range of 5–20 °C. Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun. LX 225–230.

Laroche, C., Fine, F., Gervais, P., 2005. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. Int. J. Food Microbiol. 97, 307–315. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.023.

Laroche, C., Gervais, P., 2003. Unexpected thermal destruction of dried, glass bead-immobilized microorganisms as a function of water activity. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3015–3019. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.5.3015-3019.2003.

UNCORRECTED PROOF

Lemetais, G., Dupont, S., Beney, L., Gervais, P., 2012. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96, 471–480. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4014-3.

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592–3597.

Lesn, J., Berthet, S., Binard, S., Rouxel, A., Humbert, F., 2000. Changes in culturability and virulence of Salmonella Typhimurium during long-term starvation under desiccating conditions. Int. J. Food Microbiol. 60, 195–203. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00311-1.

Lian, F., Zhao, W., Yang, R., Tang, Y., Katiyo, W., 2015. Survival of Salmonella enteric in skim milk powder with different water activity and water mobility. Food Control 47, 1–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.036.

Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2013. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: a review. Int. J. Food Microbiol. 167, 310–321. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016.

Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of Salmonella enterica kinetic behavior. Food Microbiol. 28, 828–837. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006.

Lin, L.-C., Beuchat, L.R., 2007. Survival of Enterobacter sakazakii in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. Food Microbiol. 24, 767–777. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.02.001.

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G., 2006. Preservation of micro-organisms by drying; a review. J. Microbiol. Methods 66, 183–193. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017.

Osaili, T., Forsythe, S., 2009. Desiccation resistance and persistence of Cronobacter species in infant formula. Int. J. Food Microbiol. 136, 214–220. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006.

Pehkonen, K.S., Roos, Y.H., Miao, S., Ross, R.P., Stanton, C., 2008. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of Lactobacillus rhamnosus GG (LGG). J. Appl. Microbiol. 104, 1732–1743. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x.

Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., Elliott, P.H., 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of Salmonella in low-moisture foods. J. Food Prot. 73, 1919–1936.

Potts, M., 2001. Desiccation tolerance: a simple process?. Trends Microbiol. 9, 553–559. http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02231-4.

Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. 58, 755–805.

R Development Core Team, 2008. R: a Language and Computing, Statistical Computing. [WWW Document]. R Found. Stat. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rychlik, I., Barrow, P.A., 2005. Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. FEMS Microbiol. Rev. 29, 1021–1040. http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.005.

Shen, S., Fang, F.C., 2012. Integrated stress responses in Salmonella. Int. J. Food Microbiol. 152, 75–81. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.017.

Shrestha, A.K., Howes, T., Adhikari, B.P., Bhandari, B.R., 2007. Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder. LWT - Food Sci. Technol. 40, 1593–1600. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.003.

Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Heat and acid tolerance of Listeria monocytogenes after exposure to single and multiple sublethal stresses. Food Microbiol. 25, 294–303. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.008.

Spector, M.P., Kenyon, W.J., 2012. Resistance and survival strategies of Salmonella enterica to environmental stresses. Food Res. Int. 45, 455–481. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056.

Van Doren, J.M., Neil, K.P., Parish, M., Gieraltowski, L., Gould, L.H., Gombas, K.L., 2013. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973-2010. Food Microbiol. 36, 456–464. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.014.

Xu, Y.Z., Métris, A., Stasinopoulos, D.M., Forsythe, S.J., Sutherland, J.P., 2015. Effect of heat shock and recovery temperature on variability of single cell lag time of Cronobacter turicensis. Food Microbiol. 45, 195–204. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.003.

Yan, Q.Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B.D., Fanning, S., 2012. Cronobacter species (formerly known as Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. J. Appl. Microbiol. 113, 1–15. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x.

Zhou, K., George, S.M., Métris, A., Li, P.L., Baranyi, J., 2011. Lag phase of Salmonella enterica under osmotic stress conditions. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1758–1762. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02629-10.

UNCORRECTED PROOF

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

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

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

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

* lbeney@u-bourgogne.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

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

Editor: Adelaide Almeida, University of Aveiro, PORTUGAL

Received: September 11, 2015

Accepted: January 18, 2016

Published: February 3, 2016

Copyright: © 2016 Zoz et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

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

month. Subculture was performed by inoculation of five colonies in 10 mL of TSB and incubated overnight at 25°C. Final culture was performed by diluting the subculture to adjust the final OD_{600} to 0.005 in 50 mL of fresh TSB before incubation at 25°C for 24 h to reach the stationary growth phase.

Preparation of environmental drying chambers and polypropylene coupon

The controlled environment drying chambers were hermetic plastic boxes (20 cm × 13 cm × 6 cm) containing a saturated salt solution to control RH [29]. A saturated solution of NaCl, KI, K_2CO_3, and LiCl (Sigma-Aldrich) was added at the bottom of the drying chambers to obtain 75%, 68%, 43%, and 11% RH in the hermetic box, respectively. A ventilator of 4.1 W (max.) with a diameter of 80 mm and a height of 25 mm comprising seven blades (Sunon, Radiospares, France) was placed in the drying chamber to control the rate of drying.

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

Dehydration and rehydration processes

Dehydration conditions. Stationary growth phase cultures of EGDe, CCL500, CCL128, and LO28 strains (25 mL) were centrifuged for 10 min at 3645 ×*g* and washed once with phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich). Pellets were suspended in 20 mL of PBS. For desiccation experiments, 10 μL of cell suspension with a final concentration of 1×10^9 CFU/mL was placed onto the hydrophobic polypropylene coupons, a surface that can be found in the food industry in tanks, pipeworks, accessories, and on cutting surfaces [40]. Samples were placed in the drying chambers on a rack to keep them above the salt solutions. The various conditions (11%, 43%, 68%, and 75% RH for 30, 60, 90, 120, and 180 min) were tested while the chambers were maintained at 25°C and ventilated at the same rate to increase desiccation. Variations in the operating rate of the ventilator inside the drying chamber allowed control of the hydric equilibrium between the sample and air with the various rates. The ventilator rate was changed by controlling the input voltage to the ventilator (3, 5, 7.5, and 12 V).

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

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

Dehydration and rehydration cycle

Suspensions of CCL500, EGDe, CCL128, and LO28 strains were prepared as described above. Samples were placed into the drying chambers containing saturated solutions of K_2CO_3 or KI reaching 43% and 68% RH, respectively, and the chambers were maintained at 25°C and ventilated for 180 min. At the end of the first cycle, bacterial cells were rehydrated instantaneously with 10 μL of distilled water and samples were reintroduced into the chamber at 25°C for 180

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

Measurement of cell cultivability

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

Drying kinetics

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

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

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

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

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

Statistical analysis

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

Results

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

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

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

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

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

Dehydration at 68% RH showed evaporation characteristics almost identical to those at 75% RH. Indeed, at 30 min of drying, sample weight at 68% RH was not significantly different than at 75% RH (Fig 1B and 1C). There was no more weight loss after 90 min of drying. Viability of the four strains of *L. monocytogenes* at 68% RH decreased slightly during the first 60 min for all strains. After 60 min, viability continued to decline strongly with a significant difference ($p < 0.05$) to 180 min (Fig 1C). Indeed, at 180 min, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the decrease in viability of LO28, which is more sensitive, and the other strains. Cell survival decreased for the four strains between 180 and 960 min after drying at 68% RH, and no bacterial survival was detected at 960 min in any strain, involving a decrease in cell viability of more than 4.5 $\log_{10}$ units.

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

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

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

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

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

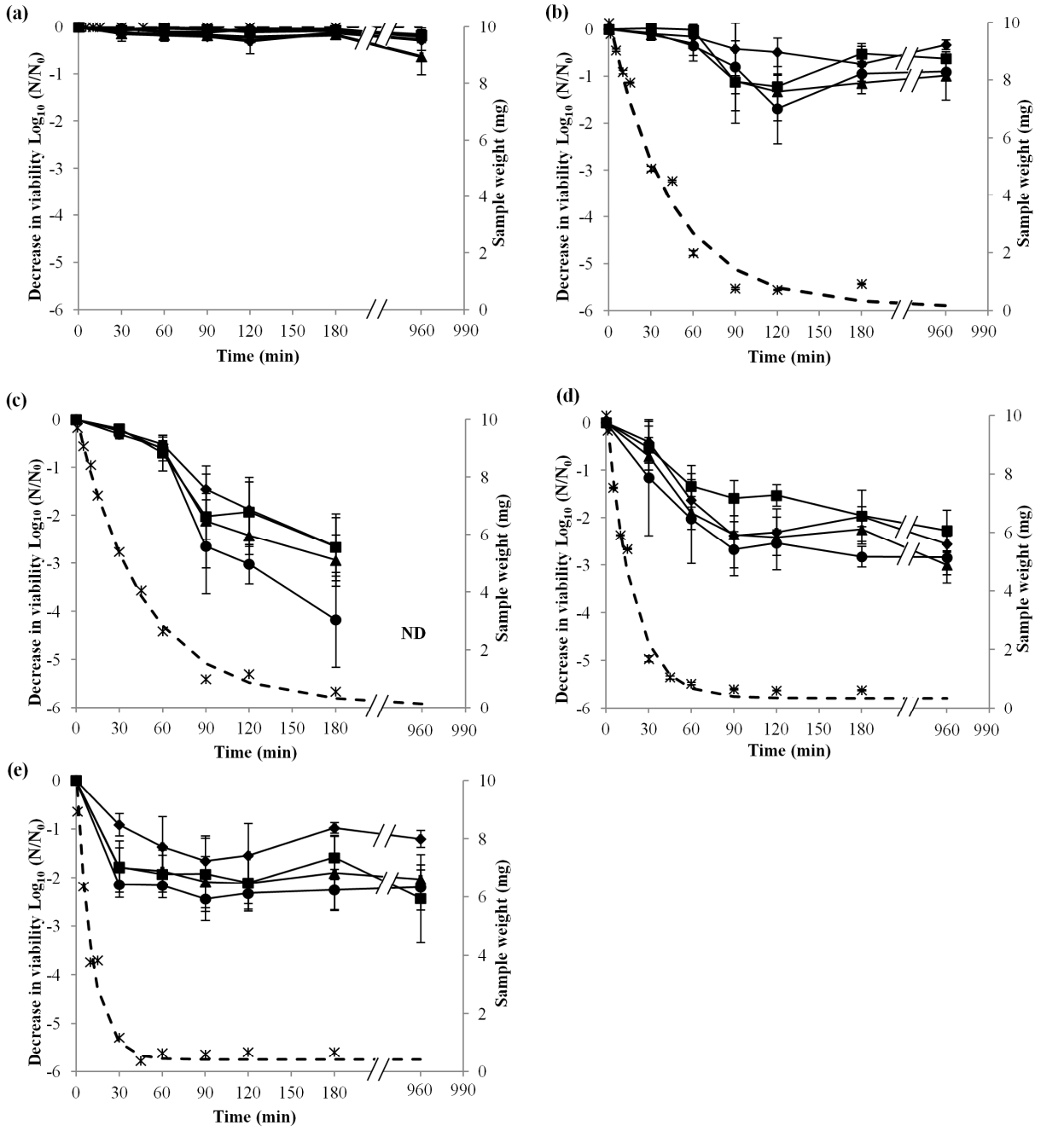

Fig 1. *L. monocytogenes* survival at different RH. Decrease in viability of *L. monocytogenes* strains, EGDe (square), CCL500 (diamond), CCL128 (triangle), and LO28 (circle), during desiccation on polypropylene coupons incubated at 25°C and 99% RH (a), 75% RH (b), 68% RH (c), 43% RH (d), and 11% RH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

doi:10.1371/journal.pone.0148418.g001

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

Impact of rehydration kinetics on *L. monocytogenes* survival

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

Effect of an additional dehydration–rehydration cycle

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

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

Discussion

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

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

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

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

RH drying chambers	Kinetics parameters of dehydration			Decrease in viability of *L. monocytogenes* strains (Log_{10} (N/N_0), (± SD) *)							
	V_{max} (10^{-3} mg/min)	τ(min)	Time when 95% of weight sample is evaporated (min) = 3τ	EGDe		CCL500		CCL128		LO28	
				180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min	180 min	960 min
43%	0.72	13.69	41.07	−2.32 (± 0.40)^{ab}	−3.74 (± 0.6)^{c}	−2.59 (± 0.41)^{abc}	−3.02 (± 0.28)^{abc}	−2.77 (± 0.29)^{ab}	−3.49 (± 0.24)^{b}	−3.11 (± 0.17)^{a}	−3.97 (± 0.26)^{a}
	0.56°	17.81	53.43	−1.95 (± 0.54)^{a}	−2.27 (± 0.43)^{ab}	−1.97 (± 0.21)^{a}	−2.55 (± 0.16)^{abc}	−2.24 (± 0.31)^{a}	−3 (± 0.2)^{ab}	−2.82 (± 0.21)^{a}	−2.84 (± 0.52)^{a}
	0.32	31.24	93.72	−2.43 (± 0.78)^{ab}	−3.36 ± (0.65)^{bc}	−2.36 (± 0.72)^{ab}	−3.1 (±0.35)^{bc}	−2.51 (± 0.55)^{ab}	−3.48 (±0.35)^{b}	−3.22 (± 0.31)^{a}	−4.1 (± 0.54)^{a}
68%	0.38	25.8	77.4	−3.85 (± 0.07)^{c}	< −4.5^{d}	−3.63 (± 0.32)^{c}	< −4.5^{d}	−4.15 (± 0.36)^{b}	< −4.5^{c}	< −4.5^{b}	< −4.5^{b}
	0.28	34.9	104.7	−3.08 (± 0.38)^{abc}	< −4.5^{d}	−2.81 (± 0.76)^{abc}	< −4.5^{d}	−3.47 (± 0.94)^{b}	< −4.5^{c}	−3.82(± 1.11)^{a}	< −4.5^{b}
	0.22°	45.71	137.13	−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}

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

° Results correspond to conditions studied in Fig 1.

doi:10.1371/journal.pone.0148418.t001

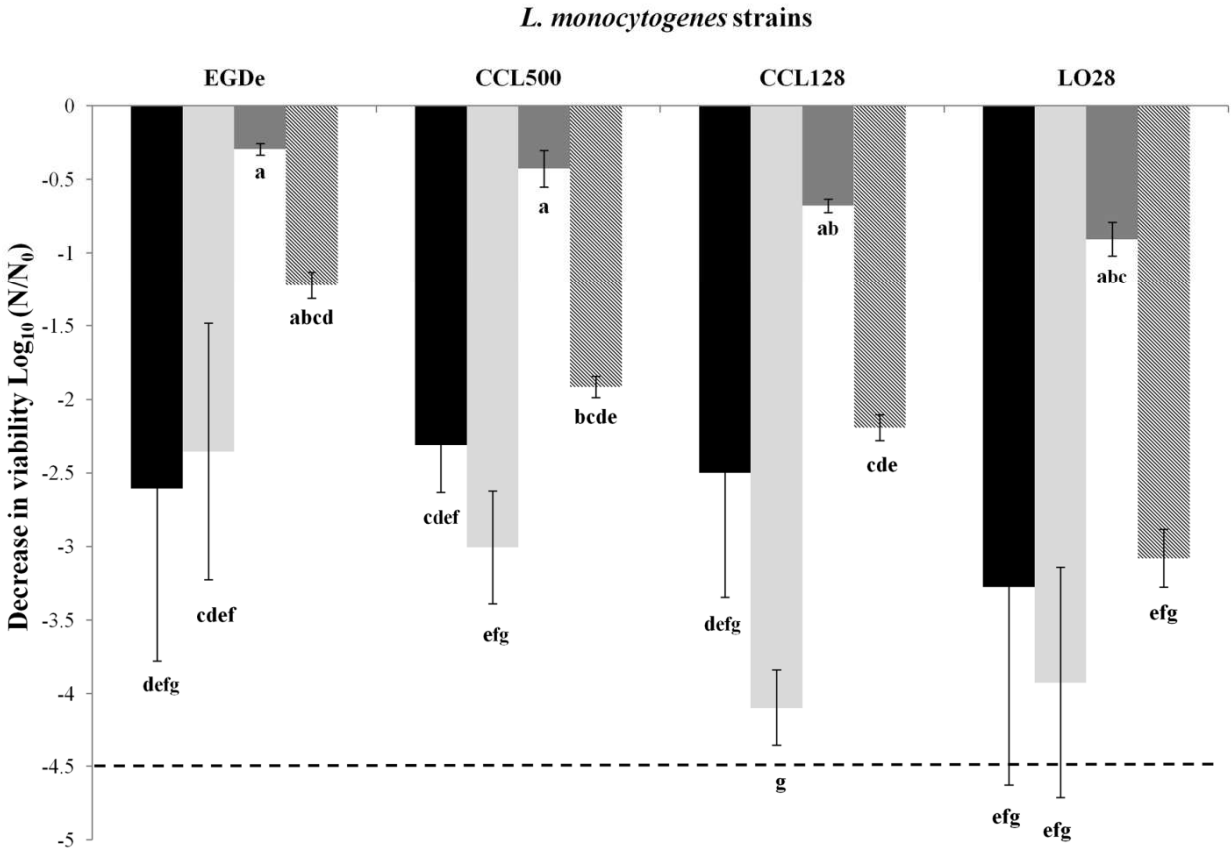

Fig 2. *L. monocytogenes* survival after different kinetics of rehydration. Decrease in viability of *L. monocytogenes* strains (EGDe, CCL500, CCL128, and LO28 strains) in PBS during desiccation on polypropylene coupons incubated at 25°C and at 43% RH or 68% RH for 180 min. Initial concentration was equivalent to 10^9 CFU/mL. Two models of rehydration were studied: an instantaneous rehydration and a progressive rehydration. Black bars correspond to drying at 68% RH with a slow rehydration and light gray bars correspond to drying at 68% RH with a rapid rehydration. Dark gray bars correspond to drying at 43% RH with a slow rehydration and hatched bars correspond to drying at 43% RH with a rapid rehydration. Error bars correspond to the SD calculated from four repeated experiments. (- - -) corresponds to the method detection limit.

doi:10.1371/journal.pone.0148418.g002

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

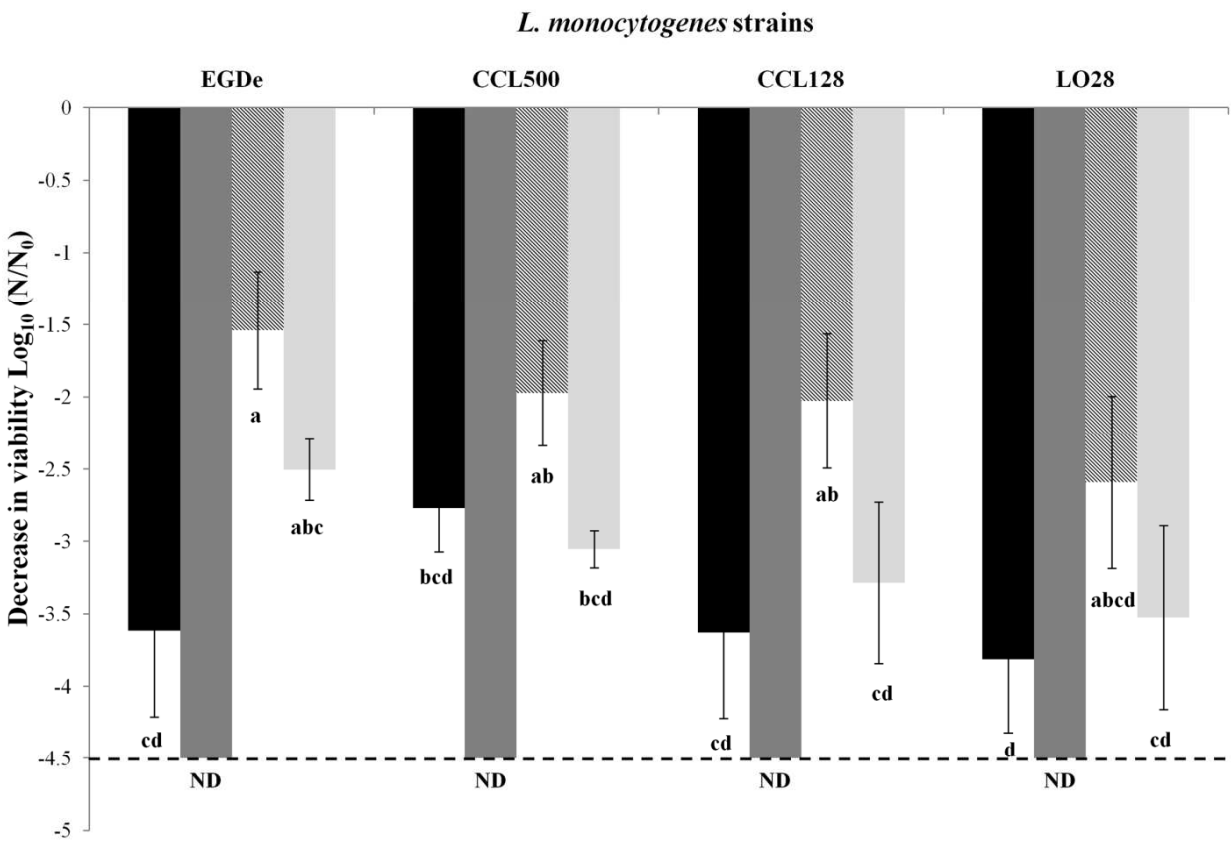

Fig 3. Impact of dehydration-rehydration cycle on *L. monocytogenes* survival. Decrease in viability of *L. monocytogenes* EGDe, CCL500, CCL128 and LO28 strains in PBS during desiccation at 43% RH and 68% RH on polypropylene coupons with one cycle at 25°C for 180 min or with two successive cycles at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

doi:10.1371/journal.pone.0148418.g003

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

phenomenon, because lethality is stabilized after transient steps of drying to 43% and 11% RH (Fig 1). Increased mortality and its progression during the holding time at 68% RH could also be related to any impact of drying level on molecular mobility. This phenomenon is exploited in many preservation methods, where biological samples are extensively dehydrated to ensure their long-term preservation. Typically, freeze-dried bacteria are preserved at below 15% RH and their preservation period is considerably reduced if this value is increased [36]. This phenomenon is related to molecular mobility, which is decreased by a few orders of magnitude when water is drastically removed [41]. Therefore, even if cell structures are disorganized or radical species are present, their displacements and interactions leading to reactions or oxidation are dramatically slowed during holding time in very dry conditions. This may explain the decrease of *L. monocytogenes* viability during its maintenance at 68% RH. Indeed, this relative humidity is low enough to promote mechanical, structural, and oxidative damages, but high enough to maintain the mobility of the cell constituents.

In our study, survival rates were generally low if compared to other studies. For example, drying the Lm568 strain with 43% RH induced a decrease in viability of −1.48 $\log_{10}$ on the first day of desiccation [45], while our study showed a decrease in viability from 2 to 4 $\log_{10}$ according to the strain studied (Table 1). Indeed, the survival rate obtained in our study was inferior, but the difference from the study of Hingston et al. (2015) could be explained by the fact that the stress response is strain dependent or by differences between the drying mediums. In our study, bacteria were dried in PBS (nutrient-free medium), while in the study of Hingston et al. (2015), bacteria were dried in nutrient medium (TSB). In PBS, bacteria may lack sufficient nutrients and energy to set up a stress response related to active mechanisms (energy production, membrane transport, protein metabolism, lipid biosynthesis, and oxidative damage). The low viability rate obtained in this study indicates that active compensation of cellular damage did not induce or was not sufficient to compensate for the physicochemical consequences of dehydration under our experimental conditions.

Efficiency of RH regulation in improving bacterial decontamination on surfaces

Finally, the main objective of this study was to evaluate the potential use of RH variation as a tool for the destruction of freshly deposited bacteria to avoid their growth on inert surfaces. We showed that this strategy is efficient and that optimal conditions can be selected. We found that the optimal conditions are an ambient RH of 68%. This level of RH promotes cell destruction during transient drying steps and promotes continuous cell destruction while they are dried (Fig 1 and Table 1), whatever mode of rehydration is applied (Fig 2). Other levels of RH are less efficient and require instantaneous rehydration or supplementary cycles of dehydration–rehydration. A level of 68% RH has the advantage of not being excessively low, because low RH levels are difficult to achieve in food plants where water is omnipresent. It is important to note that RH levels held for long periods between 50% and 70% RH are known to be detrimental to the preservation of many dried microorganisms [28]. Here we studied only *L. monocytogenes*, known for its high resistance to hydric stress [47, 48]. Our results provide good leads for the development of industrial strategies. Indeed, it will be interesting to effectively apply RH as a tool to control foodborne pathogens in the food industry, reducing the requirements for disinfectants and biocides, which are harmful to the environment.

Conclusions

This study about the impact of RH variation on the survival of *L. monocytogenes* contaminating clean surfaces revealed that RH offers the potential to reduce the establishment of pathogens in

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

Acknowledgments

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

Author Contributions

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

References

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

12. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjoberg AM, Aarnisalo K, Bjorkroth J, et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 150–155. PMID: 9872773

13. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 584–640. PMID: 11432815

14. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. J Infect Dis. 2002; 185 Suppl 1: S18–24. PMID: 11865436

15. Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol. 2007; 113: 1–15. PMID: 17010463

16. McClure PJ, Roberts TA, Oguru PO. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. Lett Appl Microbiol. 1989; 9: 95–99.

17. Walker SJ, Archer P, Banks JG. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J Appl Bacteriol. 1990; 68: 157–162. PMID: 2108109

18. Carpentier B, Cerf O. Review—Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol. 2011; 145: 1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005 PMID: 21276634

19. Miettinen MK, Björkroth KJ, Korkeala HJ. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol. 1999; 46: 187–192. PMID: 10100898

20. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Compr Rev Food Sci F. 2003; 2: 22–32.

21. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. J Appl Microbiol. 2010; 109: 1117–1131. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x PMID: 20522145

22. Alpine Slicing and Cheese Conversion Company Issues Voluntary Recall of "Edelweiss Creamery Premium Fondue Blend" Because of Possible Health Risk. 2011; **Available:** http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm286000.htm. **Accessed 21 October 2014.**

23. King And Prince Seafood Corp. Issues Voluntary Recall Notice On Nova Style Cold Smoked Salmon And Sable Fish Lox, Salmon Sushi Fillets, And Salmon Trim Because Of Possible Health Risk. 2011 [cited 2014 Oct 21]; **Available**: http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm281097.htm.

24. Rome Packing Co., Inc. Recalls Fresh And Frozen Crab Meat Because Of Possible Health Risk. 2014. **Available**: http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm420386.htm. **Accessed 21 October 2014.**

25. Sunburst Foods Recalls Products Because Of Possible Health Risk. 2014; **Available**: http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm418645.htm. **Accessed 21 October 2014.**

26. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. J Microbiol Meth. 2006; 66: 183–193.

27. Bateman JB, Stevens CL, Mercer WB, Carstensen EL. Relative humidity and the killing of bacteria: the variation of cellular water content with external relative humidity or osmolality. J Gen Microbiol. 1962; 29: 207–219. PMID: 13966801

28. Dunklin EW, Puck TT. The lethal effect of relative humidity on air-borne bacteria. J Exp Med. 1948; 87: 87–101. PMID: 18911172

29. Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. Appl Microbiol Biot. 2012; 96: 471–480.

30. McEldowney S, Fletcher M. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. Lett Appl Microbiol. 1988; 7: 83–86.

31. Vogel BF, Hansen LT, Mordhorst H, Gram L. The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. Int J Food Microbiol. 2010; 140: 192–200. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.035 PMID: 20471709

32. Takahashi H, Kuramoto S, Miya S, Kimura B. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. Food Control. 2011; 22: 633–637.

33. Mille Y, Beney L, Gervais P. Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. Biotechnol Bioeng. 2003; 83: 578–582. PMID: 12827699

34. Wolkers WF, van Kilsdonk MG, Hoekstra FA. Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. BBA-Gen Subjects. 1998; 1425: 127–136.

35. Golowczyc MA, Gerez CL, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. Biotechnol Lett. 2011; 33: 681–686. doi: 10.1007/s10529-010-0491-6 PMID: 21140192

36. Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. Appl Microbiol Biot. 1995; 44: 172–176.

37. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp). J Pathol Bacteriol. 1926; 29: 407–439.

38. Becavin C, Bouchier C, Lechat P, Archambaud C, Creno S, Gouin E, et al. Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity. MBio. 2014; 5: e00969–00914. doi: 10.1128/mBio.00969-14 PMID: 24667708

39. Vicente MF, Baquero F, Perez-Diaz JC. Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 1985; 30: 77–79.

40. Pompermayer DMC, Gaylarde CC. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. Food Microbiol. 2000; 17: 361–365.

41. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol Rev. 1994; 58: 755–805. PMID: 7854254

42. Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. Appl Microbiol Biot. 2014; 8821–8834

43. Poirier I, Marechal PA, Evrard C, Gervais P. *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress. Appl Microbiol Biotechnol. 1998; 50: 704–709. PMID: 9891930

44. Dupont S, Beney L, Ritt JF, Lherminier J, Gervais P. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. Biochim et Biophys Acta. 2010; 1798: 975–985.

45. Hingston PA, Piercey MJ, Hansen LT. Insertional mutagenesis reveals genes associated with desiccation and osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2015; (In press)

46. Stokes RH, Robinson RA. Standards solutions for humidity control at 25°C. Ind Eng Chem. 1949; 41: 2013.

47. Huang YN, Ells TC, Hansen LT. Role of sigB and osmolytes in desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in simulated food soils on the surface of food grade stainless steel. Food Microbiol. 2015; 46: 443–451. doi: 10.1016/j.fm.2014.09.007 PMID: 25475314

48. Sleator RD, Wouters J, Gahan CGM, Abee T, Hill C. Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 2692–2698. PMID: 11375182

Annexe 2 : Liste des communications

Communications orales :

- LANG E., GUYOT S., PERRIER-CORNET J.M., GERVAIS P. (2013). **Microbiological state and technologies for food powders decontamination.** *Colloque industriel, Frankfort (Allemagne)*

Communications affichées :

- LANG E., GUYOT S., PERRIER-CORNET J.M., GERVAIS P. (2014). **Impact of drying kinetics on foodborne pathogen *Salmonella enterica* survival.** *Food Micro 2014, Nantes (France)*
- LANG E., GUYOT S., PERRIER-CORNET J.M., GERVAIS P. (2015). **Impact des conditions de séchage sur la survie de *Salmonella enterica*.** *Congrès annuel de la Société Française de Microbiologie, Paris (France)*
- LANG E., GUYOT S., PERRIER-CORNET J.M., GERVAIS P. (2015), **Impact of drying kinetics on foodborne pathogen *Salmonella enterica* survival**. *International Association for Food Protection European Symposium, Cardiff, UK*
- LANG E., GUYOT S., PERRIER-CORNET J.M., GERVAIS P. (2015). **Impact des conditions de séchage sur la survie de *Salmonella enterica*.** *Forum des jeunes chercheurs, Dijon (France)*

RÉSUMÉ

Les produits alimentaires secs sont courants dans l'industrie agroalimentaire. Cependant, leur innocuité n'est pas toujours assurée et de nombreux cas de toxi-infections alimentaires collectives à travers le monde sont annuellement recensés. Deux bactéries pathogènes sont particulièrement impliquées, l'une correspond à grand nombre de cas, Salmonella enterica, et l'autre est reconnue pour sa capacité à résister aux perturbations environnementales, Cronobacter spp.. Une compréhension plus poussée de l'impact du séchage et traitement thermique à l'état sec peut permettre une optimisation des procédés de de décontamination des produits alimentaires secs et contribuer à réduire le nombre de toxiinfections alimentaires. Dans un premier chapitre, une attention particulière a été portée au procédé de séchage de microorganismes pathogènes qui peut, s'il est conduit de manière rapide, réduire considérablement la cultivabilité microbienne. De cette façon, le séchage peut être considéré comme une étape supplémentaire de décontamination à condition d'en optimiser les conditions d'application. Puis dans un deuxième chapitre, l'impact de la réhydratation, rarement traitée jusqu'à présent, a été étudié afin de proposer des conditions permettant de maximiser l'inactivation bactérienne. Cette étude remet partiellement en cause les dénombrements de bactéries pathogènes dans les aliments qui peuvent être, dans quelque cas, sous estimées du fait de l'utilisation de réhydratation rapide. Dans un troisième chapitre, l'application de différents traitements thermiques sur du lait en poudre, destiné à une population dite sensible, a permis de comprendre le rôle couplé de l'activité de l'eau et de la température sur l'efficacité du traitement thermique à l'état sec mais également de proposer un modèle d'inactivation thermique des pathogènes. Il a été notamment possible de définir un paramètre représentatif de l'effet de l'activité de l'eau (yaw). Les mécanismes de mort cellulaire pour les deux bactéries ont été ensuite étudiés, que ce soit après un séchage ou après un traitement thermique. Il apparait clairement que le séchage induit majoritairement une perméabilisation de la membrane tandis que le traitement thermique des cellules viables séchées dégrade majoritairement l'activité enzymatique en détruisant peu la membrane. Finalement, il a été montré que la virulence des deux pathogènes étudiés est augmentée par le séchage mais que le traitement thermique à l'état sec n'a pas d'impact sur cette virulence. Les connaissances apportées par cette étude peuvent être utiles d'un point de vue industriel, afin d'optimiser au mieux les conditions d'application des différents procédées pour une inactivation bactérienne maximale.

Mots clés : *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, séchage, réhydratation, traitement thermique, physiologie, virulence

ABSTRACT

Dried food products are common in food industry. Nevertheless, their safety is not well insured, involving numerous outbreaks every years around the world. Particularly, two pathogenic bacteria are of interest, one of them due to its number of cases, Salmonella enterica, and the other one due to its ability to survive environmental perturbations, Cronobacter spp.. A deeper comprehension of drying and heat treatment in dried state impact could lead to an optimization of drying and heating processes, insuring food safety. In the first instance, drying was considered as a supplementary decontamination step by optimizing its conditions of use. In a second phase, the rehydration impact was studied in order to found optimal conditions of pathogen inactivation. The study questions the rehydration currently puts in practice for food safety analysis. In a third phase, several heat treatments on a dried food product, intended to susceptible population, permitted to understand the specific role of water activity on the efficiency of heat treatment in dried state, and also propose a modelling for bacterial heat inactivation. In addition, it was possible to define two new parameters which represent the effect of temperature (zT) and the effect of water activity (yaw). Fourth, cellular death mechanisms for both studied bacteria, during the drying or during the heat treatment, were considered. It was clear that drying involved mainly membrane damages whereas heat treatment involved mainly enzymatic damages. Finally, in a fifth part, it was shown that virulence properties of both studied bacteria were affected by drying, increasing invasion capacity, but not by heat treatment in dried state. To finish, the knowledges brought by this study are useful for industrial point of view, in the case of drying and heat process optimization and also by proposing biological indicators to valid process efficiency in situ.

Keywords: *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, drying, rehydration, heat treatment, physiology, virulence