

Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid : Implication en sécurité des aliments

N. ELMNASSER^{1,2}, M. RITZ-BRICAUD¹, S. GUILLOU¹, F. LEROI³, N. ORANGE⁴, A. BAKHROUF² et M. FEDERIGHI^{1*}

¹ Unité Mixte de Recherche INRA Sécurité des Aliments 1014, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Route de Gachet, BP 40706-44307 Nantes cedex 03, France.

² Laboratoire d'Analyse et de Contrôle des Polluants Chimiques et Microbiologiques de l'Environnement. Faculté de Pharmacie de Monastir, Rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisie.

³ Laboratoire de Génie Alimentaire, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105-44311 Nantes cedex 03, France.

⁴ Laboratoire de Microbiologie du Froid, IUT d'Evreux, 55, Rue Saint-germain, 27000 Evreux France.

* Corresponding author : e-mail : federighi@vet-nantes.fr

RÉSUMÉ

Listeria monocytogenes est un pathogène psychrotrophe d'origine alimentaire, responsable d'infections humaines invasives. C'est un micro-organisme ubiquitaire et capable de survivre dans des conditions de stress froid et salin rencontrés dans l'industrie de la transformation et le traitement des aliments. Une stratégie utilisée par plusieurs bactéries et en particulier par *L. monocytogenes* pour l'adaptation au stress osmotique est l'accumulation des solutés compatibles. Ce pathogène utilise deux types de réponses adaptatives aux basses températures : l'ajustement de la fluidité membranaire par un changement de la composition des acides gras membranaires et l'accumulation d'osmolytes de l'environnement. Nous décrivons dans cette revue les mécanismes mis en jeu par *L. monocytogenes* pour répondre aux stress froid et osmotique liés aux procédés de fabrication alimentaire, et à montrer l'implication de cette adaptation en sécurité des aliments.

Mots-clés : *Listeria monocytogenes* - adaptation - stress salin - stress froid - sécurité des aliments.

SUMMARY

Adaptative response of *Listeria monocytogenes* to osmotic and chill stress : consequences on food safety. By N. ELMNASSER, M. RITZ-BRICAUD, S. GUILLOU, F. LEROI, N. ORANGE, A. BAKHROUF and M. FEDERIGHI.

Listeria monocytogenes is a psychrotrophic food-borne pathogen. This organism is problematic for food production industry due to its ubiquitous distribution in nature and its tolerance to condition of osmotic and chill stress. One common strategy employed by many bacteria and by *L. monocytogenes* for adaptation to osmotic stress is by the intracellular accumulation of compatible solutes. Two different types of adaptative responses to low temperature have undertaken by *L. monocytogenes*. One of the responses is accomplished by adjusting membrane fluidity through alteration of the membrane fatty acid composition. A second response consists in the accumulation of osmolytes. In this brief review we will focus on these general systems which are of particular significance to understand the behaviour of this pathogen to the osmotic and chill stress encountered during food process, and we describe some of the consequences of stress adaptation in terms of food safety.

Keywords : *Listeria monocytogenes* - adaptation - osmotic stress - chill stress - food safety.

Introduction

Listeria est un pathogène ubiquitaire largement représenté dans l'environnement. Il est capable de proliférer et de survivre dans différents biotopes comprenant les écosystèmes naturels, les denrées alimentaires et le tractus intestinal des animaux [35]. Durant son cycle de vie, *Listeria* peut rencontrer de nombreuses conditions de stress : déficit alimentaire, pH extrême, stress oxydatif, stress osmotique, stress thermique ... [6, 8, 77]. Les traitements utilisés au cours de la transformation et la conservation des aliments sont souvent associés à ces types de stress. La croissance et l'adaptation des bactéries à des conditions de stress permettent généralement une augmentation de la résistance de ces dernières aux facteurs létaux après adaptation aux stress environnementaux : c'est la notion de stress préparant. *Listeria*, comme les autres micro-organismes, peut surmonter l'effet inhibiteur de conditions de stress en développant des mécanismes physiologiques et génétiques d'adaptation [75]. La contamination des aliments par cette bactérie pathogène intervient souvent lors de contaminations croisées dans l'environnement des ateliers où la bactérie est fréquemment retrouvée. Ce haut

degré d'adaptation et la diversité des réponses possibles sont les raisons principales qui rendent le contrôle de ce pathogène difficile dans de nombreux produits alimentaires.

1- Adaptation au stress osmotique

L. monocytogenes possède d'étonnantes capacités d'adaptation au stress salin. En effet, elle est capable de croître en présence de 10 % [35, 86] voire même de 14 % de NaCl [37]. LIU *et al.* [59] ont montré que *L. monocytogenes* pouvait résister pendant 20 heures à une concentration de NaCl saturée (40 %). De même, elle peut survivre dans du sel pur pendant 150 jours à température ambiante [43].

1-1 LA RÉPONSE DE TYPE KCL

Une stratégie souvent employée par plusieurs bactéries pour ce type d'adaptation est l'accumulation intracellulaire de divers solutés [38]. Pendant l'adaptation au stress salin, une accumulation initiale de K⁺ empêche la plasmolyse et conduit à la restauration de la pression de turgescence en pré-

servant l'équilibre osmotique d'un côté et de l'autre de la membrane plasmique, avec des forces osmotiques similaires entre le cytoplasme et le milieu environnant les cellules. Comme chez la majorité des bactéries, l'accumulation de K^+ peut constituer la réponse primaire vis-à-vis d'un choc hyperosmotique chez *L. monocytogenes* [45, 71]. Les travaux de PATCHETT *et al.* [71] ont montré que la concentration en ions K^+ en présence de 7,5% de NaCl, était deux fois supérieure à celle obtenue en l'absence de sel (0,319 M en présence de 7,5% NaCl contre 0,163 M en absence de sel). Cependant, aucune variation significative de la teneur en ions K^+ intracellulaire n'a pu être mise en évidence aux faibles concentrations en sel (2,5% et 5%) dans le milieu de croissance. Ces auteurs ont suggéré que l'accumulation en ions K^+ comme osmoprotecteur chez *L. monocytogenes* ne se produisait qu'aux fortes concentrations en NaCl dans le milieu environnant. Ce serait une réponse à court terme, transitoire, et survenant dès qu'il y a modification de l'osmolarité extracellulaire. A une concentration de K^+ de 48 mM, BRONDTSED *et al.* [20], ont observé une légère diminution du taux de croissance pour les mutants du gène *KdpE* à la suite d'une exposition à 2% de NaCl. Cet effet est plus prononcé quand la concentration en K^+ est réduite à 0,048 mM, alors qu'en absence de NaCl la croissance de la souche parentale et des mutants est identique. De fait, le locus *Kdp* influence la capacité de *L. monocytogenes* d'utiliser K^+ comme osmoprotecteur. Le gène *KdpE* contribue alors à l'adaptation et à la survie de *L. monocytogenes* à forte osmolarité. De même, KALLIPOLITIS et INGMER [52] ont montré l'implication de *KdpE* dans l'halotolérance. Chez *Escherichia coli*, l'expression du système d'accumulation de K^+ à forte osmolarité est également dépendante du *KdpE* [76].

1-2 LA RÉPONSE DE TYPE SOLUTÉS COMPATIBLES

L'adaptation de cette bactérie à l'osmolarité du milieu extérieur passe, notamment, par l'accumulation d'autres solutés organiques, dits solutés compatibles, à l'intérieur du cytosol [86]. Cette accumulation est une réponse secondaire faisant suite à la réponse primaire évoquée ci-dessus. Il s'agit, à l'inverse, d'une réponse à long terme. En effet, l'augmentation de la concentration en NaCl de 0 à 7,5 % entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en acides aminés de 166 à 716 mM [71]. Ces solutés peuvent être accumulés à de très fortes concentrations dans le cytoplasme des cellules exposées au stress osmotique et permettent de contrebalancer une pression osmotique extérieure élevée en restaurant le volume cellulaire sans affecter la structure et la fonction des macromolécules intracellulaires [10, 85].

Les solutés compatibles peuvent soit provenir du milieu environnant et être transportés vers le cytoplasme des cellules, soit être synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules [45]. Le soluté compatible préféré par la majorité des bactéries [38], et *L. monocytogenes* n'y fait pas exception [7], est la glycine bêtaïne. En effet, la présence de 130 μ M de ce composé entraîne l'augmentation d'un facteur 11 du taux de croissance à 8 % de NaCl et d'un facteur 1,8 à 4 % [54].

Ce soluté est considéré comme une substance universelle, commune à tous les organismes cellulaires des différents règnes biologiques [38]. Ce soluté possède une très forte solubilité. Ainsi, il peut être accumulé à une concentration élevée dans le cytoplasme sans produire d'effets défavorables sur la structure protéique [99].

L. monocytogenes ne peut pas synthétiser la glycine bêtaïne à partir d'un précurseur de type choline. Par contre, elle est capable de capter des concentrations élevées de solutés compatibles dans le milieu extérieur, comme la glycine bêtaïne et la carnitine grâce à des systèmes de transport activés aussi bien lors de stress osmotiques que dans des conditions de basses températures [41, 54, 72]. Les différents transporteurs sont représentés schématiquement dans la figure 1.

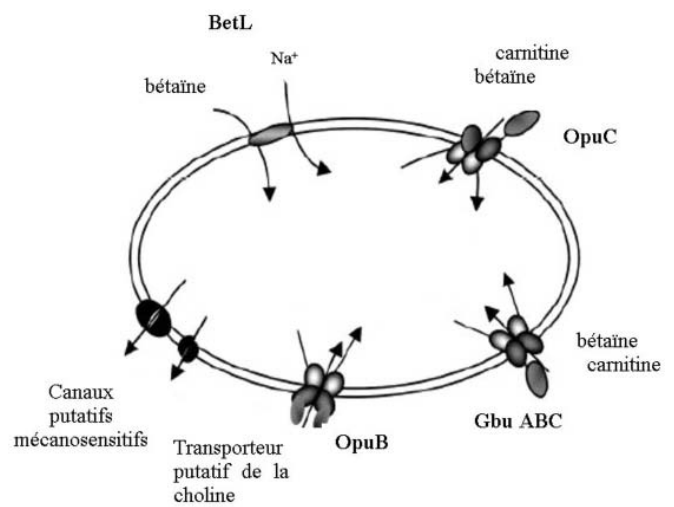


FIGURE 1. — Représentation schématique des transporteurs participant au transport des osmolytes chez *L. monocytogenes*.

KO *et al.* [54] ont montré que l'accumulation maximale de bêtaïne avait lieu pour 4 % de NaCl ajouté. A cette concentration, le taux d'accumulation est 200 fois plus élevé qu'en absence de sel. PATCHETT *et al.* [72] n'ont pas observé de stimulation de l'accumulation de la bêtaïne chez les cellules de *L. monocytogenes* lors d'un choc osmotique causé par du saccharose. L'absence d'accumulation de bêtaïne chez les cellules soumises à un stress osmotique en absence de Na^+ suggère que le transport de glycine bêtaïne est couplé à un gradient de Na^+ [54, 72]. GERHARDT *et al.* [41] ont démontré que le saccharose et le KCl étaient capables de produire *in vitro* l'accumulation active de bêtaïne dans les vésicules membranaires en présence d'une certaine concentration de Na^+ . L'activation de cette perméase de bêtaïne, désignée transporteur de bêtaïne I, est efficace seulement quand le stress osmotique est associé à la présence de Na^+ : il s'agit donc d'un système de transport de type sodium-dépendant [3, 66]. *BetL* codant pour ce transporteur est le premier élément génétique lié à l'osmotolérance. La mutation de *BetL* entraîne une réduction significative du taux de croissance à osmolarité élevée par rapport au type parental [82]. Ce gène code pour une protéine de transport membranaire : *BetL* (55 Kda). La séquence d'acides aminés de cette protéine pré-

sente une homologie avec celle de la protéine de transport OpuD de *Bacillus subtilis* (57% d'homologie) et de la protéine BetP de *Corynebacterium glutamicum* (41% d'homologie) [82].

L'existence d'un autre système d'accumulation de bétaïne a été mise en évidence en utilisant des vésicules membranaires préparées à partir de cellules cultivées dans des conditions de stress osmotique causé par du saccharose (pas de Na⁺). Ce système désigné transporteur de bétaïne II (Gbu) est de type ATP-dépendant. Il est activé par un choc osmotique imposé par le saccharose ou le KCl, indépendamment de la présence de Na⁺ [42]. Le transporteur II identifié, Gbu, codé par l'opéron *GbuABC* est un transporteur de type ABC [54]. En utilisant la stratégie de mutagenèse par transposon, KO et SMITH [55] ont isolé un mutant de *L. monocytogenes* montrant une réduction significative du taux de croissance dans des conditions de stress osmotique et de basse température, ainsi qu'une réduction concomitante de l'accumulation de la bétaïne (une réduction de 4 fois à osmolarité élevée par rapport au type parental, et de 8 fois sous condition de stress froid). L'analyse de la séquence d'ADN d'une région comprenant le site d'insertion du transposon, a révélé 3 cadres de lecture ouvert (ORFs), montrant une homologie vis-à-vis de gènes codant pour l'accumulation de bétaïne, *OpuA* de *Bacillus subtilis* [53] et *ProU* d'*Escherichia coli* [62]. Ce système de transport dépend de l'ATP (indépendamment de Na⁺). *BetL* (dépendant de Na⁺) et *GbuABC* (dépendant d'ATP) constituent les systèmes d'accumulation de la bétaïne [91].

L'activité du transporteur II lors d'une forte osmolarité est plus élevée que celle du transporteur I. De plus, le transporteur I est responsable de l'accumulation de la majeure partie de la glycine bétaïne immédiatement après un choc osmotique. Cette protection immédiate est probablement produite par l'activation d'enzymes préexistants. Mais il peut fournir aussi une protection à long terme à basse osmolarité ($\leq 3\%$ de NaCl) [66]. A l'inverse, le transporteur II joue un rôle dominant dans l'adaptation à long terme et particulièrement à osmolarité élevée ($\geq 4\%$) [3, 82].

Après la glycine bétaïne, la carnitine est l'osmolyte le plus efficace chez *L. monocytogenes*. VERHEUL *et al.* [89] ont démontré que l'accumulation de carnitine se produisait dans des conditions de basse osmolarité (2 % de NaCl). Cette accumulation reste constante à des concentrations de NaCl plus élevées. Le système de transport *OpuC* est nécessaire à l'accumulation de carnitine. L'opéron *OpuC* codant pour le transporteur *OpuC* est homologue à *OpuC* et *OpuB* chez *Bacillus subtilis*. Comme dans le cas du système Gbu, l'accumulation d'osmolyte par *opuC* est couplée à l'hydrolyse d'ATP [83]. Une réduction importante de l'accumulation de carnitine et une incapacité à être utilisée en tant qu'osmoprotecteur efficace ont été observées, à osmolarité élevée, chez des mutants *OpuC* [83]. En l'absence des activités *BetL* et *GbuABC*, *OpuC* peut participer au transport de faibles quantités de bétaïne. De même, l'homologue *OpuC* chez *Bacillus subtilis* a été identifié à l'origine comme un système d'accumulation de bétaïne.

L'accumulation d'osmolyte observée chez le triple mutant (*betL*, *gbu* et *OpuC*) suggère la possibilité d'existence d'au

moins un autre système d'accumulation de carnitine (*OpuB*) [91]. L'analyse de la séquence de gène *OpuB* a révélé la présence de deux ORFs (*OpuBA* et *OpuBB*) orientés dans la même direction et précédés par un promoteur dépendant de sigma β . La protéine *OpuB* codée par *OpuB* est homologue à *OpuB* chez *Bacillus subtilis* et présente une organisation similaire au système d'accumulation de glycine bétaïne nommé *BusA* ou *OpuA* chez *Lactococcus lactis* (85). Chez *Bacillus subtilis* *OpuB* assure le transport de choline qui est transformé en glycine bétaïne par deux enzymes *GbsB* et *GbsA* [16]. En utilisant des mutants *OpuB*, il a été montré que *OpuB* paraît jouer un rôle mineur dans la croissance à basse température et haute osmolarité. GARDAN *et al.* [39] ont montré que la protéine de stress général *Ctc* chez *L. monocytogenes* est impliquée dans l'osmotolérance en absence de solutés compatibles dans l'environnement. Après un stress osmotique (5,5% de NaCl), aucune différence de croissance est observée entre la souche sauvage et la souche mutante en *ctc* dans un milieu riche ou un milieu minimum additionné de glycine bétaïne ou de carnitine, alors que dans un milieu minimum avec 3,5% de NaCl la croissance de la souche mutante en *ctc* est réduite par un facteur 2.

Lors de l'affaiblissement du transport de glycine bétaïne et de carnitine, les cellules de *L. monocytogenes* exposées au stress osmotique augmentent leur accumulation de glutamate. Le même phénomène est observé à basse température [3].

Une étude menée par SLEATOR *et al.* [84] a permis d'identifier l'opéron *proBA* codant pour deux enzymes similaires à ceux qui ont été identifiés chez *Escherichia coli* comme catalyseurs dans la première et la seconde étape de la biosynthèse de la proline : la glutamyl kinase (GK) et la glutamyl phosphate réductase (CPR). Le gène *proB* code pour la protéine GK (30,03 kDa) et le gène *proA* code pour la protéine CPR (45,5 kDa). Ces auteurs ont montré que l'inactivation de l'opéron *proBA* réduisait la croissance de *L. monocytogenes* dans un milieu complexe contenant de faibles concentrations en sel (2 à 4 % de NaCl) ou de fortes concentrations en sel (>6 % de NaCl). Ceci suggère que la biosynthèse de la proline peut jouer un rôle important dans la survie de *L. monocytogenes* dans un milieu à osmolarité élevée et dépourvu d'osmolytes. BOREZÉE *et al.* [17] ont identifié l'opéron *OppA* contribuant à l'accumulation de peptides dans des situations de stress osmotique. La protéine codée par cet opéron *OppA* est une lipoprotéine attachée à la partie externe de la membrane cytoplasmique. Cette protéine présente 32 % d'homologie avec la protéine équivalente *OppA* chez *Bacillus subtilis* [85].

Les systèmes d'accumulation de solutés organiques (solutés compatibles) ou non organiques (ions K⁺) ont une importance primordiale pour tous les organismes face à une variation de la pression osmotique.

1-3 RÉGULATION DE TRANSPORT DE SOLUTÉS COMPATIBLES CHEZ *L. MONOCYTOGENES*

Le facteur de stress général sigma β joue un rôle dans la coordination de la réponse osmotique chez *L. monocytogenes* en dirigeant la transcription des gènes codant pour les

transporteurs de solutés. Il est donc nécessaire à l'accumulation efficace des osmolytes. En effet, une mutation dans le gène sigma β conduit à un défaut considérable de la capacité de croissance et à une diminution de la capacité à utiliser la bétaïne et la carnitine comme osmoprotecteurs au cours d'un choc hyperosmotique [10]. De même, sigma β contribue aussi à la protection contre le stress osmotique chez *Bacillus subtilis* [90] et *Staphylococcus aureus* [24].

D'une façon générale l'activité de sigma β est stimulée par de nombreux signaux physiques. Elle est couplée aux signaux par une cascade complexe de 8 protéines différentes Rsb qui modulent la liaison de sigma β à son régulateur primaire à travers des séries d'interactions protéiques et de transferts de phosphate [11]. Les résultats de CHATURONGAKUL et BOOR [25], indiquent que les protéines RsbT et RsbV contribuent à l'activation de *L. monocytogenes* durant l'exposition au stress environnemental (stress osmotique et acide) et au stress énergétique (déficit en carbone, phase stationnaire, réduction de l'ATP intracellulaire). CETIN *et al.* [23], ont identifié les éléments de promoteurs responsables de la transcription des gènes *opuC*, *gbuA* et *betL*. En effet, *betL* est transcrit à partir d'un promoteur indépendant de sigma β , alors que *gbuA* est transcrit à partir de deux promoteurs, l'un est indépendant de sigma β (*gbuAP1*) tandis que l'autre dépend de sigma β (*gbuAP2*). *OpuC* est transcrit exclusivement à partir d'un promoteur dépendant de sigma β . Le promoteur *betL* est similaire à celui de *gbuA* qui ne dépend pas de sigma β .

OKADA *et al.* [70], ont identifié *relA*, le gène codant pour la synthèse de (p)ppGpp (tétra ou pentaphosphate guanosine), qui est impliqué dans l'osmotolérance. Ce gène partage une forte homologie avec ses équivalents chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. L'inactivation de *relA* a causé une réduction d'osmotolérance chez *Listeria*. La mutation a mis en évidence une déficience de l'accumulation de (p)ppGpp, mais elle n'a pas affecté la virulence de ce micro-organisme.

WONDERLING *et al.* [96], ont montré que le gène *htrA* était nécessaire à une croissance optimale en conditions de stress osmotique. Ce gène est homologue à *htrA* codant pour la serine protéase identifiée comme protéine de réponse au stress chez plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

2- Adaptation au stress froid

La température est à l'évidence l'un des facteurs les plus importants affectant la croissance des bactéries. De plus, elle modifie d'une façon significative la composition en acides gras de la plupart des micro-organismes [47].

L. monocytogenes peut se développer entre 1 et 44°C. L'optimum de croissance se situe vers 35°C (le temps de doublement à 35°C est de 40 min), mais *Listeria* se développe entre +3 et +4°C voire même à -2°C (le temps de doublement à +4°C est de 15 heures).

L'exposition des microorganismes à basse température entraîne des changements au niveau de la synthèse protéique, de la membrane et d'autres structures cellulaires pour

l'adaptation aux nouvelles conditions environnementales [13].

Deux types différents de réponse adaptative à basse température ont été décrits chez *L. monocytogenes* :

- Ajustement de la fluidité membranaire par un changement de composition en acides gras membranaires [4].
- Accumulation des solutés compatibles de l'environnement [86].

2-1 AJUSTEMENT DE LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE

L'adaptation bactérienne à basse température entraîne une modification de la quantité et de la composition lipidique membranaire dont le but est d'assurer une fluidité membranaire optimale dans un processus appelé "adaptation homéovisqueuse" (l'état physique idéal des lipides membranaires est maintenu durant les changements des profils d'acides gras en réponse au changement de température de croissance) [8].

L'adaptation des bactéries à basse température concerne l'insaturation des acides gras, la proportion des acides gras à double liaison, la ramification (*anteiso* / *iso*) et la longueur de la chaîne des acides gras pour maintenir un niveau de fluidité adéquat [28].

L'adaptation à basse température de *L. monocytogenes* est accomplie par les types de ramification *iso* et *anteiso* et par la diminution de la longueur de la chaîne des acides gras, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de C15:0 *anteiso* et une diminution de la quantité de C17:0 *anteiso* [79]. L'étude de CHIHIB *et al.* [26] a montré chez *L. monocytogenes* ScottA, une diminution de l'acide gras C15:0 *iso* de 16,9% à 7,6% lors d'une réduction de la température de 37 à 4°C. Une quantité élevée de 62,2% est observée à 4°C pour l'acide gras C15:0 *anteiso*. Lors d'une réduction de la température de 37 à 4°C, les acides gras C17:0 *iso* et C17:0 *anteiso* ont été réduits de 16,6 et 5,3 fois respectivement. L'analyse du spectre RMN du ¹H et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ont révélé une réduction de la proportion (-CH₂-)/[-CH₃] à 5°C. Ceci reflète l'augmentation de la proportion C15/C17 [63].

Les acides gras ramifiés (ramification *anteiso*) augmentent la fluidité de la membrane cytoplasmique. En effet, ces structures perturbent l'ordre de l'empaquetage des chaînes d'acides gras entre les bicouches lipidiques. La ramification est créée par une synthèse de novo en utilisant la synthétase des acides gras ou Acyl CoA : ACP transacylase. Les chaînes courtes d'acides gras sont incapables de franchir les deux couches membranaires et de former des interactions hydrophobes avec d'autres lipides ou protéines : ceci rend la membrane plus fluide [78].

A l'identique, les acides gras polyinsaturés des lipides membranaires sont essentiels à la croissance des bactéries à basse température. En effet, la désaturation des acides gras favorise la fluidité de la membrane [80]. La double liaison *cis* va créer une déstabilisation de la membrane en introduisant des plissements au niveau des chaînes hydrocarbonées qui vont se propager largement et occuper plus de volume.

Ceci augmente la fluidité de la membrane et lui permet de maintenir sa capacité de réguler l'activité de systèmes de transport de solutés et la fonctionnalité des enzymes membranaires essentiels. Les acides gras insaturés en *trans* ont une structure linéaire longue comme les acides gras saturés, occupant ainsi moins de volume et créant des membranes plus ordonnées [79, 9]. Le changement d'insaturation des acides gras membranaires se fait selon deux voies principales :

- en anaérobiose, par synthèse *de novo* grâce à l'action de l'acide gras synthétase,
- en aérobie, par l'action d'un enzyme membranaire multi-composant : la désaturase [28].

Les bactéries utilisant l'enzyme désaturase ont une synthétase qui produit seulement les acides gras saturés. Pour produire les acides gras insaturés, la désaturase va créer des doubles liaisons au niveau des acides gras saturés [28]. La modification de l'insaturation à l'aide de l'enzyme désaturase est généralement rapide car ce processus s'effectue à l'intérieur de la membrane en modifiant des lipides intacts. Par contre, les changements de ramification et de longueur de chaîne d'acides gras sont des processus longs car ils nécessitent une synthèse *de novo* de toute la molécule lipidique par des enzymes cytoplasmiques qui sont généralement liés à la croissance [28].

De même, d'autres facteurs environnementaux comme le pH et la salinité peuvent modifier le profil des acides gras de plusieurs micro-organismes. Ces modifications adaptatives vis-à-vis du stress salin sont produites pour maintenir l'homéostasie cellulaire lors du traitement hyperosmotique. Le changement du profil d'acides gras dans des conditions hyperosmotiques conduit probablement à la rigidité membranaire permettant la rétention d'osmoprotecteurs intracellulaires durant le processus d'osmoadaptation [26]. Ce processus a été identifié chez *Bacillus subtilis* [60].

2-2 SOLUTÉS COMPATIBLES ET SYNTHÈSE DES PROTÉINES DU CHOC FROID (CSPS)

La croissance de *L. monocytogenes* à basse température est très liée à l'accumulation de solutés organiques. On retrouve la glycine bêtaïne et la carnitine parmi les osmolytes les plus utilisés par cette bactérie pour la cryotolérance [2, 54, 86]. ANGELIDIS *et al.* [2] ont montré que la glycine bêtaïne était le cryotolérant favorisé par *L. monocytogenes* pour sa croissance. L'accumulation de carnitine est nécessaire à la croissance à basse température pendant la phase stationnaire de *L. monocytogenes*. La carnitine pourrait avoir la fonction de transporteur dans le processus de modification des acides gras durant l'adaptation de *L. monocytogenes* à basse température [11]. Le mécanisme d'activation du transport de la glycine bêtaïne au cours d'un stress froid peut entraîner des changements d'interactions hydrophobes entre les protéines membranaires ou entre les protéines et la membrane, car les interactions sont faibles à basse température. Ainsi le système de transport activé au cours du stress froid aurait des implications sur l'état physique de la membrane cellulaire [42]. L'accumulation de la glycine bêtaïne par *L. monocyto-*

genes est plus importante à des températures comprises entre 5 et 7°C, elle est maximale à 12°C, puis elle décroît d'une façon significative avec l'augmentation de la température à 25°C et on n'observe pas d'accumulation à 30°C [66]. De plus, à la différence du transporteur I (BetL), le transporteur de bêtaïne II (Gbu) répond fortement au stress froid en l'absence d'activation osmotique [66 ; 55 ; 94]. Le taux d'accumulation de bêtaïne est 15 fois plus élevé à 7°C qu'à 30°C [54]. Après la mutation de *BetL*, aucune différence significative du taux de croissance n'est observée à basse température. Ceci indique que *BetL* ne joue aucun rôle dans l'accumulation de la bêtaïne au cours de la cryotolérance [82]. De plus le transporteur de carnitine codé par le gène *OpuC* est aussi fortement induit après un choc froid [94].

En plus des facteurs température et osmolarité du milieu de culture, SMITH [86] a démontré que la phase de croissance était également un facteur conditionnant la quantité absolue d'osmolyte accumulée.

L'adaptation de *L. monocytogenes* à 10°C entraîne des modifications de composés cellulaires autres que lipidiques. Après l'exposition au stress froid, des modifications de synthèse des protéines membranaires et d'autres structures cellulaires, de remaniement de la surface cellulaire, et l'induction de régulateurs globaux ont lieu [58]. La caractéristique commune de la réponse des bactéries à l'adaptation à basse température est l'induction d'un groupe spécifique des protéines nommé protéines de choc froid (Csps : cold shock proteins) [49, 98, 73, 67, 29]. En effet, BAYLES *et al.* [8] en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle ont observé une augmentation de production de 12 protéines de stress froid (Csps) en réponse à une réduction de température de 37°C à 5°C. PHAN-THANH et GORMON, [74] ont décrit aussi une augmentation significative de production de 32 protéines à la suite d'une diminution de température de 37°C à 5°C. De même HÉBRAUD et GUZZO [46] ont montré l'induction d'au moins 10 protéines après un choc froid. La plupart des Csps présentent une masse moléculaire similaire avec les protéines identifiées chez *L. monocytogenes* par BAYLES *et al.* [8] et PHAN-THANH et GORMON, [74].

WEMEKAMP-KAMPHUIS *et al.* [92] ont observé une augmentation d'expression de Csps de 1,5 et 4 fois après 2 et 20 heures respectivement à 10°C. Ces auteurs ont identifié 4 CSPs nommées Csp1, 2, 3 et 4 codées par 4 gènes *csp*. Après diminution de température de 37 à 10°C, le niveau de l'expression de Csp1 et Csp3 augmente de 10 et 3,5 fois respectivement, alors que celui de Csp2 et Csp4 est stable. La production de ces protéines est importante durant la phase stationnaire après un choc froid. L'augmentation continue de la production de Csp1 et Csp3 indique que ces Csps ne sont pas seulement requis pour l'acclimatation mais aussi pour la croissance à basse température [92].

De même le transfert de ce pathogène de 30 à 5°C est caractérisé par une induction brusque de protéines de faible poids moléculaire. Parmi celles-ci une semble être majeure pour le choc froid, elle présente une séquence N-terminale homologue à la ferritine chez *L. innocua*. Ceci permet de dire que la principale Csp chez *L. monocytogenes* appartient à la famille de ferritin-like proteins (Flps) [46]. Chez *Escherichia*

coli, 3 protéines majeures ; CspA, CspB, CspG sont produites après un choc froid [98].

Pour *Bacillus subtilis*, une protéine de choc froid nommée CspB, a été identifiée [95]. MAYER *et al.* [64] ont montré l'induction d'au moins 3 protéines majeures chez *Bacillus cereus* après croissance à 7°C. La protéine la plus abondante est CspA. Cette protéine est similaire à celle chez *Escherichia coli* (CspA) et chez *Bacillus subtilis* (CspB). De manière intéressante, WOUTERS *et al.* [97] ont montré l'induction des protéines du choc froid (Csps) chez la bactérie thermophile *Streptococcus thermophilus* à 20°C, alors qu'à 10°C le niveau d'induction est réduit.

Les CSPs ne sont pas seulement induites à basse température mais elles sont aussi induites sous d'autres conditions de stress. CspA, la protéine majeure du choc froid chez *Escherichia coli*, est aussi exprimée pendant la phase stationnaire [18]. De plus, parmi les 9 protéines Csps trouvées chez *Escherichia coli*, cinq ne sont pas exprimées à basse température. CspD, par exemple, est induite lors d'un stress nutritionnel et pendant la phase stationnaire [98]. *Bacillus subtilis* possède 3 CSPs, CspB, C, et D qui sont induites après un choc froid mais, CspB et CspC sont aussi induites durant la phase stationnaire [44].

2-3 RÉGULATION DE L'ADAPTATION À BASSE TEMPÉRATURE

Durant un choc froid, le facteur sigma β joue un rôle important dans l'adaptation des cellules de *L. monocytogenes* en phase stationnaire. En effet, *L. monocytogenes* présente un mécanisme indépendant de sigma β pendant la croissance exponentielle et un autre dépendant de sigma β pendant la phase stationnaire. Sigma β est nécessaire à l'accumulation efficace de bétaïne et de carnitine au cours de l'adaptation de *L. monocytogenes* au stress froid [69]. En effet, quand 1mM de bétaïne ou de carnitine est additionné à une culture de *L. monocytogenes* au moment de la diminution de la température (8°C), le taux de croissance augmente de 0,09 à 0,18 par heure respectivement. L'ajout de bétaïne ou de carnitine à des souches mutantes en sigma β n'a pas d'effet significatif sur la croissance [11]. De même, l'activité de sigma β est détectable lors d'une exposition à basse température chez *Bacillus subtilis* [19]. Néanmoins, pendant la diminution de la température, un système de transduction de signal à 2 composants contrôlant l'induction de l'expression de gènes à basse température, est identifié chez *Bacillus subtilis*. Ce système est constitué d'une histidine kinase (DesK) qui détecte probablement le changement de la fluidité membranaire, et d'un régulateur de réponse DesR qui se lie à la région promoteur des gènes *des* [1]. BRONTSSED *et al.* [20] ont montré que le gène *KdpE* contribuait à l'adaptation et à la survie de *L. monocytogenes* à basse température.

3- Implications en sécurité des aliments

L'adaptation aux conditions de stress chez *L. monocytogenes* et d'autres pathogènes peut stimuler leur survie dans les aliments et l'augmentation de la cross-protection (protec-

tion croisée) face aux stress sublétaux associés aux traitements subis lors de la transformation alimentaire. La contamination des aliments par cette bactérie pathogène intervient souvent à la suite de contaminations croisées dans l'environnement des ateliers où la bactérie est fréquemment retrouvée. De plus, les stress sublétaux peuvent induire une réponse de type formes Viables Non Cultivables et/ou influencer sur le degré de virulence des souches, autant d'éléments en lien direct avec le risque alimentaire représenté par cette bactérie

3-1 PROTECTION CROISÉE (CROSS-PROTECTION)

La capacité de *L. monocytogenes* à tolérer le stress salin est importante, puisque ce pathogène est souvent exposé à un tel environnement durant la transformation et la conservation des aliments. DUCHE et LABADIE [31] ont montré que le pré-traitement de *L. monocytogenes* à des concentrations faibles en NaCl ne permettait pas d'augmenter la résistance à des concentrations de NaCl plus élevées. En revanche, FALEIRO *et al.* [34] ont montré que des souches de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire pré-incubées avec 3,5 % de NaCl, pouvaient produire une réponse d'osmotolérance. Des études ont montré que *L. monocytogenes* une fois adaptée à la salinité observait une protection croisée contre les autres stress. L'exposition au stress osmotique augmente la résistance de *L. monocytogenes* à des concentrations de H₂O₂ (0,1%) mais pas au choc acide (pH 3,5) ni à l'éthanol (17,5 %) [56, 61]. Les cellules de *L. monocytogenes* précédemment cultivées en présence de NaCl sont plus résistantes à la température de réfrigération que celles cultivées sans NaCl [33]. Ainsi, SHAHAMAT *et al.* [81] ont montré que le temps de survie de *L. monocytogenes* à 25,5 % de NaCl était de 3 jours à 37°C, de 24 jours à 22°C et de 132 jours à 4°C.

La croissance à 4°C est une particularité qui peut être utilisée comme procédé d'enrichissement. La conservation à la température de réfrigération élimine les bactéries concurrentes, et stimule donc la croissance de *L. monocytogenes* [6]. La pré-incubation des cellules bactériennes de *L. monocytogenes* à 4°C augmente leur résistance à basse température. Ceci indique que la survie est influencée par les conditions préalables de culture des cellules bactériennes [69]. Par exemple, un choc froid entraîne une meilleure survie à la congélation (le niveau de survie est 90%). Ce phénomène d'adaptation à la congélation par pré-exposition à basse température a été décrit chez plusieurs bactéries comme *Bacillus subtilis* et *Lactococcus lactis* [93]. La pré-exposition des cellules de *L. monocytogenes* à basse température augmente de 100 fois leur survie après un traitement par pression hydrostatique de 300 MPa [93]. A l'inverse, chez *L. monocytogenes*, la résistance à pH faible et la thermotolérance diminuent à la suite d'une exposition au choc froid. Cet effet d'un choc froid illustre la possibilité d'utiliser un stress imposé comme moyen de rendre les micro-organismes plus sensibles aux étapes de transformation alimentaire [8, 34, 56, 68]. La réduction de la thermotolérance des bactéries à basse température peut être due au changement de profil des acides gras membranaires, ce qui augmente la fluidité membranaire, la réduction de la viscosité et la diminution de la thermorésistance [51]. De même, la suppression de la synthèse protéique au cours d'un choc froid peut être responsable de la perte de la thermorésistance [68].

Les stress osmotique ou froid entraînent des modifications morphologiques des cellules bactériennes. L'apparition des cellules filamenteuses avec de multiples *septa* tout au long de la cellule chez *L. monocytogenes* est observée lors d'un choc osmotique [4]. JORGENSEN *et al.* [50] ont montré que *L. monocytogenes* soumise à des concentrations de NaCl de 8,7 % donnait aussi des cellules filamenteuses. De même, la croissance à une concentration de NaCl de 5 % et à pH 5 entraînait l'apparition de courts filaments de 2 à 5 µm de longueur. Cette structure filamenteuse est bien visualisée à 10 % de NaCl [12]. La formation de filaments observée chez *L. monocytogenes* pour différentes concentrations de NaCl pourrait être liée à la mise en jeu d'un mécanisme adaptatif [48].

LI *et al.* [57] ont montré qu'une longue incubation de *L. monocytogenes* à 4°C en présence de dioxyde de carbone induisait l'apparition de cellules plus allongées. De même, ces cellules stressées accumulaient plus d'énergie que les cellules normales. En effet, la concentration d'ATP mesurée chez les cellules stressées est plus élevée que chez les cellules normales. L'accumulation de l'énergie est une stratégie permettant l'induction de systèmes de réparation à de récupération des cellules stressées. Par contre, THOLOZAN *et al.* [88] ont montré que l'application de la pression hydrostatique à *L. monocytogenes* provoquait une diminution progressive de 90% de l'ATP.

3-2 IMPLICATION DANS LA SURVIE : FORMES VNC

L. monocytogenes peut survivre à 4°C pendant 4 semaines dans le PBS (Tampon Phosphate Salin) avec une augmentation progressive des cellules endommagées de 10 % jusqu'à 20 à 60 % selon les souches et les conditions d'incubation [32]. Durant le processus de transformation alimentaire, les bactéries peuvent être exposées pendant quelques heures à plusieurs jours à différents stress comme la salinité et la basse température. La présence de cellules stressées dans les aliments pose un problème d'hygiène des aliments, étant donné que les souches ne peuvent pas être détectées par les procédures standard d'isolement.

Le nombre de bactéries décrites sous formes VNC est connu, et a largement augmenté ces dernières années. La plupart sont des bactéries à Gram-négatif, mais la perte de capacité à former des colonies a également été montrée chez quelques bactéries à Gram-positif comprenant *L. monocytogenes* [14, 27]. La température et la concentration en NaCl sont les facteurs les plus importants induisant la perte de capacité à former des colonies [15].

L'hypothèse "viable non cultivable" est un sujet d'intérêt et de discussion pour plusieurs microbiologistes des aliments et soulève des questions sur le potentiel de menace des bactéries qui ne peuvent pas être détectées par les tests standard de microbiologie, l'existence de formes VNC posant ainsi un problème de santé publique [36].

3-3 IMPLICATION DANS LA VIRULENCE DE *L. MONOCYTOGENES*

La capacité de *L. monocytogenes* à survivre dans des conditions de stress froid ou osmotique est importante. En

effet, elle peut s'adapter à la température corporelle, survivre dans les conditions acides rencontrées dans l'estomac, résister aux acides gras volatils dans l'intestin, concurrencer la flore intestinale naturelle et survivre dans le phagosome du macrophage. Cette faculté d'adaptation est associée à une variation de l'expression des gènes nécessaires à la survie dans les conditions de stress rencontrées au cours de la transformation alimentaire participant à la résistance, à la survie et à l'invasion cellulaire. La capacité de survie à osmolarité élevée dans la lumière intestinale, par l'accumulation de carnitine à travers le système OpuC est également essentielle pour la colonisation [83].

La température environnementale et la concentration saline sont des facteurs importants qui ont une influence sur l'expression des gènes de virulence chez plusieurs espèces bactériennes [65]. L'expression des facteurs de virulence chez *L. monocytogenes* est influencée par la concentration en NaCl et la température [21, 30, 87].

De plus, GENG *et al.* [40] ont montré une réduction de l'expression des antigènes cellulaires réagissant avec les anticorps suite à une exposition à une concentration de NaCl de 5,5 % pendant 3 h. Le pouvoir pathogène des souches cliniques de *L. monocytogenes* après inoculation chez des poussins embryonnés n'avait pas changé après 4 semaines d'incubation à 4°C dans le PBS. En revanche, ces auteurs ont montré que le pouvoir pathogène avait diminué de 30 à 90 % pour les souches d'origine alimentaire après 4 semaines d'incubation à 4°C [5; 22]. De plus, BUNCIC *et al.* [22] ont montré que la production intracellulaire de listeriolysine était fortement diminuée après incubation des bactéries à la température de réfrigération (4°C). La perte de l'activité listeriolysine serait due à la suppression de l'expression de son gène.

Conclusion

L. monocytogenes est un micro-organisme pathogène capable de tolérer et de s'adapter facilement aux conditions de stress salin et froid. Le phénomène d'adaptation ou de renforcement aux stress, qui fait référence à une augmentation de la résistance à des facteurs létaux après adaptation à des stress environnementaux, peut interférer avec l'efficacité de certains moyens de conservation et compromettre ainsi la salubrité des denrées alimentaires. *L. monocytogenes*, peut survivre à des conditions extrêmes de pH, de NaCl ou de température, survie largement influencée par des stress préparants. Ces derniers ont une influence positive sur la survie (protection croisée) ou diminuent la résistance aux autres stress. Une telle diversité de comportements nécessite à l'évidence de poursuivre les travaux de recherche permettant de mieux les caractériser et de mieux les comprendre. Cette compréhension fine permettra une plus juste appréciation du risque et une meilleure adéquation des options de gestion du risque lié à ce micro-organisme.

Références bibliographiques

1. — AGUILAR P.S., HERNANDEZ-ARRIAGA A.M., CYBULSKY L.E., ERAZO A.C., DE MENDOZA D. : Molecular basis of thermo-

- sensing : a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.*, 2001, **20**, 1681-1691.
2. — ANGELIDIS S.A., SMITH L.M., SMITH G.M. : Elevated carnitine accumulation by *Listeria monocytogenes* impaired in glycine betaine transport is insufficient to restore wild-type cryotolerance in milk whey. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **75**, 1-9.
 3. — ANGELIDIS S.A., SMITH G.M. : Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 1013-1022.
 4. — ANNOUS B.A., BECKER L.A., BAYLES D.O., LEBADA D.P., WILKINSON B.J. : Critical role of anteiso-C15 :0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, **63**, 3887-3894.
 5. — AVERY S.M., BUNCIC S. : Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37°C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Food Microbiol.* 1997, **34**, 319-327.
 6. — BAJARD S., ROSSO L., FARDEL G., FLANDROIS J.P. : The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub optimal condition. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, **29**, 201-211.
 7. — BAYLES D.O., ANNOUS B.A., WILKINSON B.J. : Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperature. 1996, **66**, 4351-4355.
 8. — BAYLES D.O., WILKINSON B.J. : Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000, **30**, 23-27.
 9. — BEALES N. : Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (CRFSFS)*. 2004, **3**, 1-20.
 10. — BECKER L.A., CETIN M.S., HUTKINS R.W., BENSON A.K. : Identification of the gene encoding the alternative sigma factor β from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* 1998, **180**, 4547-4554.
 11. — BECKER L.A., EVANS S.N., HUTKINS R.W., BENSON A.K. : Role of β in addition of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 2000, **182**, 7083-7087.
 12. — BEREKSI N., GAVIN F., BÉNÉZECH T., FAILLE C. : Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* ScottA and LO28 under saline and acid environments. *J. Appl. Microbiol.* 2002, **92**, 556-56.
 13. — BERRY E.D., FOEGEDING P.M. : Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *J. Food Prot.* **1997**, **60**, 1583-1594.
 14. — BESNARD B., FEDERIGHI M., CAPPELLIER J.M. : Evidence of Vbnc state in *Listeria monocytogenes* by DVC and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiol.* 2000, **17**, 697-704.
 15. — BESNARD B., FEDERIGHI M., DECLERQ E., JUGIAU F., CAPPELLIER J.M. : Environmental and physico-chemical factors induce Vbnc state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* 2002, **33**, 359-370.
 16. — BOCH J., KEMPF B., SCHMID R., BREMER E. : Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis* : characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* 1996, **178**, 5121-5129.
 17. — BOREZEE E., PELLEGRINI E., BERCHE P. : OppA of *Listeria monocytogenes*, an Oligopeptide-Binding Protein Required for Bacterial Growth at Low Temperature and Involved in Intracellular Survival. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 7069-7077.
 18. — BRANDI A., SPURIO R., GUALERZI C.O., PON C.L. : Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' CspA under non stress conditions. *EMBO J.* 1999, **18**, 1653-1659.
 19. — BRIGULLA M., HOFFMANN T., KRISP A., VÖLKER A., BREMER E., VÖLKER U. : Chill induction of the sigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.* 2003, **185**, 4305-4314.
 20. — BRONDSTED L., KALLIPOLITIS B.H., INGMER H., KNÖCHEL S. : *KdpE* and a putative RsbQ homologue contribute to growth of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity and low temperature. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, **219**, 233-239.
 21. — BUNCIC S., AVERY S.M. : Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37°C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Lett. Appl. Microbiol.* 1996, **23**, 18-22.
 22. — BUNCIC S., AVERY S.M., ROGERS A.R. : Listeriolysin O production and pathogenicity of non-growing *Listeria monocytogenes* stored at refrigeration temperature. *Food. Microbiol.* 1996, **31**, 133-147.
 23. — CETIN M.S., ZHANG C., HUTKINS R.W., BENSON A.K. : Regulation of transcription of compatible solute transporters by the general stress sigma factor, σ , in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 2004, **186**, 794-802.
 24. — CHAN P.F., FOSTER S.J., INGHAN E., CLEMENTS M.O. : The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigma₃₂ controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.* 1998, **180**, 6082-6089.
 25. — CHATURONGAKUL S., BOOR K.J. : RsbT and RsbV contribute to σ^B -dependent survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, **70**, 5349-5356.
 26. — CHIHIB N.E., RIBEIRO DA SILVA M., DELATTRE G., LAROCHE M., FEDERIGHI M. : Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, **218**, 155-160.
 27. — COLBURN K.G., KAYSNER C.A., WEKELL M.M. : A viable but non-culturable state of *Listeria monocytogenes* in filtered and unfiltered fresh-water and marine water. *The 11th Symposium on problems of listeriosis* : 1992, p. 75.
 28. — DENICH T.J., BEALETTE L.A., LEE H., TREVORS J.T. : Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods.* 2003, **52**, 149-182.
 29. — DERZELLE S., HALLET B., FERAIN T., DELCOUR J., PASCAL HOLS P. : Improved Adaptation to Cold-Shock, Stationary-Phase, and Freezing Stresses in *Lactobacillus plantarum* Overproducing Cold-Shock Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, **69**, 4285-4290.
 30. — DRAMASI S., KOCKS C., FORESTIER C., COSSART P. : Internalin-mediated invasion of epithelial-cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial-growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol. Microbiol.* **1993**, **9**, 931-941.
 31. — DUCHÉ O., LABADIE J. : Effect of NaCl pretreatment on the growth and survival of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity. *Sciences des aliments.* 2003, **23**, 284-292.
 32. — DYKES G. : A. Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4°C. *J. Appl. Microbiol.* 1999, **87**, 915-922.
 33. — DYKES G.A., MOORHEAD S.M. : Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, **56**, 161-166.
 34. — FALEIRO M.L., ANDREW P.W., POWER D. : Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **84**, 207-216.
 35. — FARBER J.M., PETERKIN P.I. : *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 1991, **55**, 476-511.
 36. — FEDERIGHI M. : Les formes viables non cultivables des bactéries : point de vue et retour d'expérience d'un hygiéniste. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 2004, **19**, 237-244.
 37. — GALDIERO E., D'ISANTO M., ALIBERTI F. : Effect of saline concentration, pH and growth temperature of invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* 1997, **148**, 305-315.
 38. — GALINSKI E.A. : Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 1995, **37**, 273-328.
 39. — GARDAN R., DUCHE O., LEROY-SETRIN S., THE EUROPEAN LISTERIA GENOME CONSORTIUM, LABADIE J. : Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, **69**, 154-161.
 40. — GENG T., KIM K. P., GOMEZ R., SHERMAN D. M., BASHIR R., LADISCH M. R., BHUNIA A.K. : Expression of cellular antigens of *Listeria monocytogenes* that react with monoclonal antibodies C11E9 and EM-7G1 under acid-, salt- or temperature-induced stress environments. *J. Appl. Microbiol.* 2003, **95**, 762-772.
 41. — GERHARDT P.N.M., SMITH L.T., SMITH G.M. : Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1996, **178**, 6105-6109.
 42. — GERHARDT P.N.M., SMITH L.T., SMITH G.M. : Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 2000, **182**, 2544-2550.
 43. — GNANOU BESSE N., DUBOIS B.F., LAFARGE V., LECLERC V. : Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 2000, **89**, 944-950.
 44. — GRAUMANN P., MARAHIE M. : Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* 1999, **171**, 135-138.
 45. — GUTIERREZ C., ABBE T., BOOTH I.R. : Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, **28**, 233-244.
 46. — HEBRAUD M., GUZZO J. : The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, **190**, 29-34.
 47. — HAZEL J.R. : Thermal adaptation in biological membranes : is

- homeoviscous adaptation the explanation ? *Annu. Rev. Physiol.* 1995, **57**, 19-42.
48. — ISOM L.L., KHAMBATTA Z.S., MOLUF J.L., AKERS D.F., MARTIN S.E. : Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 1995, **58**, 1031-1033.
 49. — JONES P.G., INOUE M. : The cold-shock response \pm a hot topic. *Mol Microbiol.* 1994, **11**, 811-818.
 50. — JORGENSEN F., STEPHENS P.J., KNOCHER S. : The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, **79**, 274-281.
 51. — JUNEJA V.K., FOGLIA T.A., MARMER B.S. : Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* : effect of pH, acidulant, and growth temperature. *J. Food Protect.* 1998, **61**, 683-687.
 52. — KALLIPOLITIS B.H., INGMER H. : *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, **204**, 111-115.
 53. — KEMPF B., BREMER E. : OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1995, **270**, 16701-16713.
 54. — KO R., SMITH L.T., SMITH G.M. : Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 1994, **176**, 426-431.
 55. — KO R., SMITH L.T. : Identification of ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65**, 4040-4048.
 56. — KOUTSOUMANIS K.P., KENDALL P.A., SOFOS J.N. : Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, **69**, 7514-7516.
 57. — LI J., KOLLING G.L., MATTHEWS K.R., CHIKINDAS M.L. : Cold and carbon dioxide used as multi-hurdle preservation do not induce appearance of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 2003, **94**, 48 - 53
 58. — LIU S., GRAHAM J.E., BIGELOW L., MORSE II P.D., WILKINSON B.J. : Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, **68**, 1697-1705.
 59. — LIU D., MARK L.L., AINSWORTH A.J., AUSTIN F.W. : Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, **243**, 373-378.
 60. — LÓPEZ C.S., HERAS H., GARDA H., RUZAL S., SÁNCHEZ-RIVAS C., RIVAS E. : Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress, *Int. J. Food Microbiol.* 2000, **55**, 137-142.
 61. — LOU Y., YOUSEF AE. : Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, **63**, 1252-1255.
 62. — LUCHT J. H., BREMER E. : Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments : osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, **14**, 3-20.
 63. — MASTRONICOLIS S.K., ARVANITIS N., KARALIOTA A., LITOS C., STAVROULAKIS G., MOUSTAKA H., TSAKIRAKIS A., HEROPOULOS G. : Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2005, **22**, 213-219.
 64. — MAYR B., KAPLAN T., LECHNER S., SCHERER S. : Identification and Purification of a Family of Dimeric Major Cold Shock Protein Homologs from the Psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J. Bacteriol.* 1996, **178**, 2916-2925.
 65. — MEKALANOS J.J. : Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 1992, **174**, 1-7.
 66. — MENDUM M.L., SMITH L.T. : Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, **68**, 813-819.
 67. — MICHEL V., LEHOUX I., DEPRET G., ANGLADE P., LABADIE J., HEBRAUD M. : The Cold Shock Response of the Psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas fragi* Involves Four Low-Molecular-Mass Nucleic Acid-Binding Proteins. *J. Bacteriol.* 1997, **179**, 7331-7342.
 68. — MILLER A.J., BAYLES D.O., SHAWN EBLE N. B. : Cold shock induction of thermal sensitivity in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, **66**, 4345-4350.
 69. — MOORHEAD S.M., DYKES G.A. : Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, **91**, 63-72.
 70. — OKADA Y., MAKINIO S.I., TOBE T., OKADA N., YAMAZAKI S. : Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, **68**, 1541-1547.
 71. — PATCHET R.A., KELLY A.F., KROLL R.G. : Effet of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, **58**, 3959-3963.
 72. — PATCHET R.A., KELLY A.F., KROLL R.G. : Transport of glycine betaine by *Listeria monocytogenes*. *Arch. Microbiol.* 1994, **162**, 205-210.
 73. — PHADTARE S., ALSINA J., INOUE M. : Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr. Opin Microbiol.* 1999, **2**, 175-180.
 74. — PHAN-THANH L., GORMON T. : Analyse of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional Electrophoresis. *Electrophoresis.* 1995, **16**, 444-450.
 75. — PHAN-THANH L., GORMON T. : Stress proteins in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis.* 1997, **18**, 1464-1471.
 76. — POLAREK J.W., WILLIAMS G., EPSTEIN W. : The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992, **174**, 2145-2151.
 77. — ROWAN N.J., ANDERSON J.G. : Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, **64**, 2065-2071.
 78. — RUSSEL N.J. : Psychrotrophic bacteria-molecular adaptation of membrane lipids. *Comp. Biochemical. Physiol.* 1997, **118**, 489-493.
 79. — RUSSEL N.J. : Bacterial membranes : the effects of chill storage and food processing. An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, **79**, 27-34.
 80. — SAKAMOTO T., MURATA N. : Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Cur. Opinion Microbiol.* 2002, **5**, 206-210.
 81. — SHAHAMAT M., SEAMAN A., WOODBINE M. : Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralbl Bacteriol A.* 1980, **246**, 506-511.
 82. — SLEATOR R.D., GAHAN C.G.M., O'DRISCOLL B., HILL C. : Analysis of *BetL* in contributing to the growth and survival of *Listeria monocytogenes* LO28. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, **65**, 2078-2083.
 83. — SLEATOR R.D., WOUTERS J., GAHAN C.G.M., 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.
 84. — SLEATOR R.D., GAHAN C.G.M., HILL C. : Identification and disruption of *proBA* locus in *Listeria monocytogenes* : role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**, 2571-2577.
 85. — SLEATOR R.D., GAHAN C.G.M., HILL C. : A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, **69**, 1-9.
 86. — SMITH L.M. : Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, **62**, 3088-3093.
 87. — SOKOLOVIC Z., RIEDEL J., WUENSCHER M., GOEBEL W. : Surface-associated, *PrfA*- regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol. Microbiol.* 1993, **8**, 219-227.
 88. — THOLOZAN J.L., RITZ M., JUGIAU F., FEDERIGHI M., TISSIER J.P. : Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *J. Appl. Microbiol.* 2000, **88**, 202-212.
 89. — VERHEUL A., ROMBOUTS F.M., BEUMER R.R., ABEE T. : An ATP-dependent L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes* Scott A involved in osmoprotection. *J. Bacteriol.* 1995, **179**, 6979-6985.
 90. — VÖLKER U., MAUL B., HECKER M. : Expression of the σ_{24} -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1999, **181**, 3942-3948.
 91. — WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., WOUTERS J.A., SLEATOR R.D., GAHAN C.G.M., HILL C., ABEE T. : Multiple deletion of the osmolyte transporters *BetL*, *Gbu* and *OpuC* of *Listeria monocytogenes* affects virulence and growth at high osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002 a, **68**, 4710-4716.
 92. — WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., KARATZAS A.K., JEROEN A., WOUTERS J.A., ABEE T. : Enhanced Levels of Cold Shock Proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon Exposure to Low Temperature and High Hydrostatic Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002 b, **68**, 456-463.
 93. — WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., WOUTERS J.A., DE LEEUW P.P.L.A., HAIN T., CHAKRABOTRY T., ABEE T. : Identification of sigma factor σ^B controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004a, **70**, 3457-3466.

94. — WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., SLEATOR R.D., WOUTERS J.A., HILL C., ABEE T. : Molecular and Physiological Analysis of the Role of Osmolyte Transporters BetL, Gbu, and OpuC in Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004b, **70**, 2912-2918.
95. — WILLIMSKY G., BANG H., FISCHER G., MARAHIEL M. A. : Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J. Bacteriol.* 1992, **174**, 6326-6335.
96. — WONDERLING L.D., WILKINSON B.J., BAYLES D.O. : The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, **70**, 1935-1943.
97. — WOUTERS J.A., ROMBOUTS F.M, DE VOS W.M., OSCAR P. KUIPERS O.P., ABEE T. : Cold Shock Proteins and Low-Temperature Response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. . *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65**, 4436-4442.
98. — YAMANAKA K., FANG L., INOUE M. : The CspA family in *Escherichia coli* : multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* 1998, **27**, 247-255.
99. — YANCEY P.H., CLARK M.E., HAND S.C., BOWLUS R.D., SOMERO G.N. : Living with water stress : evolution of osmolyte systems. *Science.* 1982, **217**, 1214-1222.