



**HAL**  
open science

# Compréhension des réponses microbiennes à des perturbations de leur environnement : application au développement de procédés de maîtrise de micro-organismes

Sébastien Dupont

► **To cite this version:**

Sébastien Dupont. Compréhension des réponses microbiennes à des perturbations de leur environnement : application au développement de procédés de maîtrise de micro-organismes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bourgogne Franche-Comté (COMUE) (UBFC), 2024. tel-04804555

**HAL Id: tel-04804555**

**<https://institut-agro-dijon.hal.science/tel-04804555v1>**

Submitted on 26 Nov 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des  
Recherches de l'Université de Bourgogne Franche-Comté**

**Compréhension des réponses microbiennes à des  
perturbations de leur environnement : application au  
développement de procédés de maîtrise de  
micro-organismes**

Par

**Sébastien DUPONT**

Maître de Conférences – section CNU 62  
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques

Soutenance réalisée le 10 janvier 2024 devant le jury composé de :

Rapporteurs :

**Véronique BROUSOLE**, Directrice de Recherche INRAE à l'unité SQPOV d'Avignon

**Emmanuel GUEDON**, Directeur de recherche CNRS à l'Université de Lorraine

**Romain JEANTET**, Professeur à l'Institut Agro Rennes

Examineurs :

**Catherine BEAL**, Professeur à AgroParis Tech

**Laurent BENEY**, Professeur à l'Institut Agro Dijon

**Fabrice MARTIN**, Directeur de Recherche INRAE à l'UMR AgroEcologie Dijon

**Maeva SUBILEAU**, Maître de Conférences à l'Institut Agro Montpellier



## Remerciements

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques. Je tiens à remercier Patrick Gervais et Laurent Beney, ancien et actuel directeur de l'UMR, qui par leur dévouement pour le collectif du laboratoire ont permis de créer des conditions remarquables à la réalisation des recherches que j'ai effectuées. Je les remercie d'autant plus chaleureusement puisqu'ils ont été les témoins de mes premiers pas en recherche lors de l'encadrement de mon stage de Master Recherche puis de ma thèse. Merci beaucoup pour tous vos conseils et les discussions scientifiques qui ont été et sont toujours très enrichissants.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'UMR PAM avec une attention particulière pour les membres de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques. Mon attachement à cette équipe a toujours été indéfectible et je remercie tous ses membres pour leurs qualités humaines et scientifiques. Cela comprend mes collègues enseignants-chercheurs mais je n'oublie pas les personnels de soutien à la recherche (technique et administratif) et les nombreux stagiaires et étudiants avec qui j'ai eu la chance de travailler. Le travail présenté dans ce mémoire est aussi le fruit de leur travail aux travers de leurs activités et des discussions que nous avons pu partager. Un très grand merci à vous tous.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce mémoire. Il s'agit de Véronique Broussolle, Emmanuel Guedon, Romain Jeantet pour les rapporteurs et de Catherine Béal, Laurent Beney, Fabrice Martin, Maeva Subileau pour les examinateurs. Je les remercie également par avance des conseils qu'ils pourront me prodiguer lors de la soutenance.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres de ma famille. Bien que les distances séparant les Hauts de France et le sud de la France de Dijon soient grandes, ils m'ont encouragé et ont porté un intérêt constant à mon travail.

Mes derniers remerciements vont aux personnes qui partagent mon quotidien : Pauline, Célian et Faustine. Pauline, merci pour ton attention et ta compréhension qui me permettent de m'épanouir dans le métier d'enseignant-chercheur. Ton soutien a toujours été indéfectible depuis mes débuts en recherche. Merci pour tout ! Célian et Faustine, vous ne savez pas encore lire mais merci d'illuminer ma vie par la joie que vous apportez au quotidien. Je vous ferai lire ces remerciements dans quelques années avec probablement un peu de nostalgie.



# Table des matières

<b>1. Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Bilan des activités.....</b>	<b>5</b>
2.1. Curriculum vitae .....	6
2.2. Production scientifique.....	9
2.2.1. Publications dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture.....	9
2.2.2. Publication dans des revues scientifiques sans comité de lecture .....	12
2.2.3. Chapitre d'ouvrage .....	12
2.2.4. Produits scientifiques à destination de professionnels ou du grand public.....	12
2.2.5. Communications lors de congrès .....	13
2.2.6. Brevets et savoir-faire secret .....	18
2.3. Activités scientifiques annexes.....	19
2.3.1. Activités d'expertise scientifique.....	19
2.3.2. Membre de comité de thèse et chercheur référent de l'école doctorale .....	19
2.3.3. Activité éditoriale .....	19
2.4. Activités pédagogiques.....	20
2.4.1. Contexte d'exercice de l'activité d'enseignement.....	20
2.4.2. Volumes, répartition des différents types d'enseignement et publics concernés .....	20
2.4.3. Gestion et animation de l'enseignement.....	22
<b>3. Activités de recherche .....</b>	<b>23</b>
3.1. Introduction .....	24
3.1.1. Procédés de production et de stabilisation de micro-organismes .....	24
3.1.2. Procédés d'inactivation des micro-organismes.....	27
3.1.3. Développement actuel et optimisation des procédés microbiologiques.....	30
3.1.3.1. Production et stabilisation de micro-organismes d'intérêt .....	30
3.1.3.2. Procédés d'inactivation microbienne.....	31
3.2. Environnement, thématiques et stratégie de recherche .....	32
3.2.1. Environnement de recherche .....	32

3.2.2. Thématique, stratégie et questions de recherche.....	33
3.3. Synthèse des travaux de recherche.....	35
3.3.1. Compréhension de l'anhydrobiose par l'étude de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
3.3.1.1. Impact de la cinétique sur la survie de <i>S. cerevisiae</i> lors de perturbations hydriques .....	35
3.3.1.2. Rôle clé de l'ergostérol dans la résistance des levures aux perturbations hydriques.....	41
3.3.1.3. Rôle du tréhalose dans la persistance des levures à l'état déshydraté .....	46
3.3.2. Bactéries probiotiques : de la production à la mise en forme.....	51
3.3.2.1. Développement de milieux de production de biomasse compatibles avec une utilisation industrielle des bactéries .....	53
3.3.2.2. Stabilisation et mise en forme de bactéries d'intérêt probiotiques .....	57
3.3.3. Effet de la lumière visible à haute intensité sur les micro-organismes .....	61
3.3.3.1. Effets cellulaires de traitements lumineux à très haute intensité .....	62
3.3.3.2. Développement d'un réacteur LED à ultra haute intensité .....	65
3.3.3.3. Inactivation de micro-organismes d'altération ou pathogènes des aliments par la lumière à ultra haute intensité.....	68
3.4. Perspectives des travaux de recherche .....	72
3.5. Références bibliographiques .....	77
3.6. Expérience dans l'animation de la recherche.....	85
3.6.1. Encadrement et supervision d'étudiants.....	85
3.6.2. Collaborations scientifiques .....	88
3.6.3. Montage et pilotage de projet.....	89
3.6.4. Responsabilités collectives liées à la recherche .....	90
3.7. Sélection de 6 articles emblématiques de la recherche réalisée .....	92

# 1. Introduction générale

Suite à l'obtention d'un Master 2 Recherche en Science des Aliments (Université de Bourgogne), j'ai obtenu en 2007 une allocation de recherche du Ministère de la Recherche (bourse MENRT) pour réaliser un travail de thèse portant sur la compréhension des mécanismes de résistance cellulaire permettant à des levures de résister à la déshydratation. Ce travail de recherche a été effectué sous la direction du Pr Patrick Gervais et du Dr Laurent Beney au sein de l'équipe Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires (GPMA) d'AgroSup Dijon. L'ensemble des travaux effectués au cours de la thèse ont confirmé la forte implication de la membrane plasmique dans la mort des cellules lors de perturbations hydriques. L'étude de l'effet de la cinétique de déshydratation ainsi que l'impact de la composition membranaire en stérols sur la survie des levures aux stress hydriques a permis d'élucider certains mécanismes conduisant à la survie ou à la mort des levures lors de la déshydratation et de la réhydratation. Pendant mon doctorat, j'ai également obtenu un contrat de moniteur m'ayant permis de dispenser des enseignements au sein de l'École Nationale Supérieure de Biologie appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation (ENSBANA, Dijon) devenue ensuite AgroSup Dijon. Cette double expérience m'a fait prendre conscience de mon intérêt fort pour le métier d'enseignant-chercheur. Ce métier est devenu alors pour moi un objectif.

Suite à la thèse, ma recherche postdoctorale a été réalisée au travers de différents contrats d'ingénieur de recherche entre 2011 et 2014. Entre 2011 et 2013, j'ai été recruté comme Ingénieur de recherche contractuel sur un projet d'Innovation Stratégique Industrielle (ISI) d'Oséo. Le projet, intitulé ELIXIR, regroupait deux partenaires académiques (AgroSup Dijon et l'Université de Tours) et deux partenaires industriels (Diana Ingredients et Pierre Guérin Technologies). Il visait à produire des actifs à haute valeur ajoutée à partir de cultures de cellules végétales en suspension. L'actif visé dans ce projet était des polyphénols issus de cellules de cacao cultivées en suspension en fermenteurs. Le développement d'un procédé de conservation à long terme pour ces cellules d'intérêt a également été réalisé dans ce projet. Entre 2013 et 2014, j'ai été recruté comme ingénieur de recherche financé sur un projet régional obtenu par le consortium de recherche Membradyn. Le consortium Membradyn regroupait une cinquantaine de chercheurs dijonnais de différentes institutions (Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, INSERM, INRA, CNRS, CHU) travaillant sur le rôle de la structure et de la dynamique des membranes dans la réponse adaptative de la cellule sur des modèles divers (cellules humaines, cellules végétales, micro-organismes) avec des finalités cliniques, thérapeutiques, environnementales ou alimentaires. Mes travaux lors de ce contrat visaient à approfondir des connaissances théoriques pour proposer des stratégies de maintien de l'intégrité de la membrane de micro-organismes lors de procédés de déshydratation. Lors de ces deux contrats d'ingénieur de recherche, j'ai conservé une activité d'enseignement en réalisant des vacances. J'ai ensuite été Maître de Conférences contractuel entre 2014 et 2015 pour être finalement recruté comme Maître de Conférences à AgroSup Dijon le 18 décembre 2015 au sein de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques. Les travaux de recherche réalisés depuis mon recrutement visent à comprendre et caractériser la réponse de micro-organismes à des perturbations technologiques et environnementales. Ces connaissances

sont ensuite mises en œuvre pour développer, d'une part, des procédés de production et de conservation pour des micro-organismes d'intérêt tels que les ferments et les probiotiques, et d'autre part des procédés d'inactivation de micro-organismes d'altération.

La première partie de ce mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches présente un bilan synthétique de mes activités, comprenant à la fois mes activités de recherche et d'enseignement. Un *curriculum vitae* détaillé présente tout d'abord ma formation académique ainsi que mon parcours professionnel. Cette partie est ensuite complétée par ma production scientifique, les activités scientifiques annexes à mon activité de recherche et enfin les activités pédagogiques.

La seconde partie du mémoire est consacrée à la présentation des travaux de recherche. Cette partie débute par une introduction retraçant brièvement un historique du développement des procédés de maîtrise des micro-organismes suivie par une présentation de l'environnement, des thématiques et de la stratégie liée à la recherche que je mène. Une synthèse de mes activités de recherche suivie de perspectives associées sont ensuite développées. Enfin, cette partie se conclue avec la présentation de mes expériences dans l'animation de la recherche. Cette partie développe les aspects d'encadrement de la recherche, les collaborations scientifiques, le montage et le pilotage de projets et enfin, mes responsabilités collectives liées à la recherche. Six articles emblématiques de la recherche que j'ai effectuée jusqu'à maintenant sont finalement mis en avant à la fin de ce manuscrit.



## **2. Bilan des activités**

## 2.1. Curriculum vitae

### Etat Civil

---

#### Sébastien DUPONT

Né le 28 septembre 1982 à Saint-Quentin (02), nationalité française

40 ans, pacsé, 2 enfants

E-mail : [sebastien.dupont@agrosupdijon.fr](mailto:sebastien.dupont@agrosupdijon.fr)

Tél : 06.83.29.40.71 – 03.80.77.40.97

#### Adresse personnelle :

4, rue des poiriers burotte

21490 Bretigny

#### Adresse professionnelle :

Institut Agro Dijon

UMR PAM – Equipe PMB

1, Esplanade Erasme

21000 Dijon

### Situation actuelle

---

Depuis le **Maître de Conférences**, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, Institut Agro Dijon.  
18/12/2015

Thème de recherche : Compréhension de la réponse de micro-organismes à des perturbations technologiques et environnementales pour le développement de procédés de préservation ou de décontamination.

### Formation Académique

---

- 2011 **Doctorat en Sciences de l'Alimentation** spécialité Génie des Procédés, AgroSup/Université de Bourgogne, Dijon. (*Mention Très Honorable*)
- 2007 **Master II Recherche en Sciences de l'Alimentation**, spécialité Science des Aliments, AgroSup, Dijon. (*Mention Bien, major de promotion*)
- 2006 **Master I Biologie Cellulaire et Physiologie**, spécialité Qualité des Aliments, Université de Bourgogne, Dijon. (*Mention Assez Bien*)
- 2005 **Licence Biologie Cellulaire et Physiologie**, Université Joseph Fourier, Grenoble. (*Mention Assez Bien*)

### Expériences de Recherche & Expériences Professionnelles antérieures

---

- 2014-2015 **Maître de Conférences contractuel**, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Dijon.  
Thème de recherche : Rôle des stérols dans la protection des lipides contre un stress oxydatif.
- 2013-2014 **Ingénieur de recherche contractuel** au sein du consortium Membradyn, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Dijon.

Thème de recherche : Rôle de l'ergostérol dans la structure et la dynamique de la membrane plasmique des levures.

2011-2013 **Ingénieur de recherche contractuel** sur le projet ELIXIR (projet d'Innovation Stratégique Industrielle d'Oséo) au sein l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Dijon.

Thème de recherche : Conservation à long terme de cellules végétales en suspension par congélation et déshydratation.

2007-2011 **Doctorat** sous la direction de L. Beney (MCF, AgroSup, Dijon) et P. Gervais (PR, AgroSup, Dijon). Financement : bourse MENRT et ½ ATER. Thèse en Sciences de l'Alimentation spécialité Génie des Procédés, au sein du laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et alimentaires, AgroSup, Dijon.

Sujet de la thèse : « Implication de la membrane plasmique dans la survie de *Saccharomyces cerevisiae* lors de perturbations hydriques : rôle clé de l'ergostérol ».

2007 **Stage de Master II Recherche** (MCF, AgroSup, Dijon) au Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et alimentaires, ENSBANA, Dijon.

Sujet du stage : « Déshydratation et réhydratation cellulaires : impact sur la membrane plasmique ».

## Enseignement et Encadrement

---

- Enseignement

Depuis 2016 **Maître de Conférences** à AgroSup Dijon puis Institut Agro Dijon (≈ 250 h éq. TD, Sciences pour l'Ingénieur à AgroSup Dijon et cours en M2R, Université de Bourgogne, Dijon).

2014-2015 **Maître de Conférences contractuel** à AgroSup Dijon (192 h éq. TD, Sciences pour l'Ingénieur à AgroSup Dijon et cours en M2R, Université de Bourgogne, Dijon).

2011-2014 **Vacations** à AgroSup Dijon (≈ 50 h eq. TD/an, Sciences pour l'Ingénieur).

2010-2011 **Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche** à AgroSup Dijon (96 h eq. TD, Sciences pour l'Ingénieur).

2007-2010 **Moniteur d'Initiation à l'Enseignement Supérieur** à AgroSup Dijon (64 h eq. TD/an, Sciences pour l'Ingénieur).

- Encadrement

Thèses **3 thèses co-encadrées** à 50% : Audrey Raise (2018-2021), Pauline Ribert (2019-2021) et Léa Savard (2023-2026), **2 participations à des encadrements de thèse** : Richtier Gonçalves da Cruz (2014-2017) et Aurore Bodzen (2017-2021)

Post-doc **3 post-doctorants** : Cédric Grangeteau (2017, encadrement à 50%), Emilie Lang (2018-2020, encadrement à 50%) et Thibaut Theyry (2019-2022, encadrement à 100%)

Master 2 **8 étudiants en Master 2** depuis 2016 (1 à 33% d'encadrement, 4 à 50% et 3 à 100%)

## Responsabilités collectives

---

- **Responsabilités scientifiques**

- 2022-2024 **Coordinateur du projet inter-Carnot EFFINOX (Qualiment/Plant2Pro)**
- 2019-2021 **Coordinateur de l'ANR Jeune Chercheur GreenDeconta**
- 2019-2022 **Membre élu du conseil scientifique d'AgroSup Dijon**
- 2018-2020 **Responsable scientifique du projet de maturation IDLux**
- 2018-2019 **Responsable scientifique d'un projet collaboratif de recherche avec la société Nextbiotix**
- Depuis 2018 **Co-directeur de l'équipe PMB de l'UMR PAM**
- 2018 **Membre du comité d'organisation du colloque « Lutter contre les flores pathogènes et d'altération des industries alimentaires »**
- 2017-2018 **Porteur d'un projet scientifique AgroSup Dijon**
- 2017-2021 **Coordinateur d'une tâche sur l'ANR DOPEOS**
- 2016-2020 **Responsable de l'axe transversal de recherche « Oxydation des micro-organismes, des aliments et du vin » au sein de l'UMR PAM**
- 2016 **Responsable scientifique du projet Carnot Qualiment « Anastab »**
- 2015-2018 **Responsable d'un projet campus PHC-Osmose entre la France et la Lettonie.**
- 2012 **Membre du comité d'organisation du congrès international « Dijon Domains »**
- **Responsabilités pédagogiques**
- Depuis 2018 **Coordonnateur de la formation d'ingénieur par apprentissage d'AgroSup Dijon puis de L'Institut Agro Dijon**
- Depuis 2017 **Responsable de l'unité d'enseignement « Food Processes and Emerging Technologies » dans le master international MP<sup>2</sup> (Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes)**
- Depuis 2016 **Responsable du module d'enseignement de thermodynamique à AgroSup Dijon puis à L'Institut Agro Dijon**

## Bilan de la valorisation Scientifique

---

- 55 communications lors de congrès ou workshops
- 1 chapitre d'ouvrage
- 3 brevets et 1 savoir-faire secret (dont 1 brevet et 1 savoir-faire secret licenciés)
- 37 articles publiés dans des revues scientifiques à comité de lecture (40,5% dans les deux premiers auteurs et 13,5% dans les deux derniers auteurs), facteur d'impact moyen : 4,9.

	Web of Science	Research Gate	Google Scholar
<b>Nombre de citations</b>	903	1136	1379
<b>h-index</b>	16	17	17
<b>h/n (n=13)</b>	1,2	1,3	1,3

## 2.2. Production scientifique

### 2.2.1. Publications dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture

1. Pineau, L., Colas, J., **Dupont, S.**, Beney, L., Fleurat-Lessard, P., Berjeaud, J.-M., Bergès, T., & Ferreira, T. (2009). Lipid-Induced ER Stress : Synergistic Effects of Sterols and Saturated Fatty Acids. *TRAFFIC*, 10(6), 673-690. (IF JCR 2009 : 6,255 - Q1)
2. **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. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, 1798(5), 975-985. (IF JCR 2010 : 4,647 - Q1)
3. Deguil, J., Pineau, L., Snyder, E. C. R., **Dupont, S.**, Beney, L., Gil, A., Frapper, G., & Ferreira, T. (2011). Modulation of Lipid-Induced ER Stress by Fatty Acid Shape. *TRAFFIC*, 12(3), 349-362. (IF JCR 2011 : 4,919 - Q1)
4. **Dupont, S.**, Beney, L., Ferreira, T., & Gervais, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, 1808(6), 1520-1528. (IF JCR 2011 : 3,99 - Q1)
5. **Dupont, S.**, Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis : A fungal pathway for life on land? *EVOLUTION*, 66(9), 2961-2968. (IF JCR 2012 : 4,864 - Q1)
6. Lemetais, G., **Dupont, S.**, Beney, L., & Gervais, P. (2012). Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 96(2), 471-480. (IF JCR 2012 : 3,689 - Q1)
7. de Sarrau, B., Clavel, T., Zwickel, N., Despres, J., **Dupont, S.**, Beney, L., Tourdot-Maréchal, R., & Nguyen-the, C. (2013). Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *FOOD MICROBIOLOGY*, 36(2), 113-122. (IF JCR 2013 : 3,374 - Q1)
8. da Silva Pedrini, M. R., **Dupont, S.**, de Anchieta Câmara, A., Beney, L., & Gervais, P. (2014). Osmoporation : A simple way to internalize hydrophilic molecules into yeast. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 98(3), 1271-1280. (IF JCR 2014 : 3,848 - Q1)
9. **Dupont, S.**, Rapoport, A., Gervais, P., & Beney, L. (2014). Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 98(21), 8821-8834. (IF JCR 2014 : 3,848 - Q1)
10. de Câmara, A. A., **Dupont, S.**, Beney, L., Gervais, P., Rosenthal, A., Correia, R. T. P., & Pedrini, M. R. da S. (2016). Fisetin yeast-based bio-capsules via osmoporation : Effects of process variables on the encapsulation efficiency and internalized fisetin content. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 100(12), 5547-5558. (IF JCR 2016 : 3,420 - Q2)
11. García-Marqués, S., Randez-Gil, F., **Dupont, S.**, Garre, E., & Prieto, J. A. (2016). Sng1 associates with Nce102 to regulate the yeast Pkh-Ypk signalling module in response to sphingolipid status. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR CELL RESEARCH*, 1863(6, Part A), 1319-1333. (IF JCR 2016 : 4,521 - Q1)

12. Ragon, M., Minh, H. N. T., Guyot, S., Loison, P., Burgaud, G., **Dupont, S.**, Beney, L., Gervais, P., & Perrier-Cornet, J.-M. (2016). Innovative High Gas Pressure Microscopy Chamber Designed for Biological Cell Observation. *MICROSCOPY AND MICROANALYSIS*, 22(1), 63-70. (IF JCR 2016 : 1,891 - Q2)
13. Meneghel, J., Passot, S., **Dupont, S.**, & Fonseca, F. (2017). Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 101(4), 1427-1441. (IF JCR 2017 : 3,34 - Q2)
14. Allouche, R., **Dupont, S.**, Charriau, A., Gervais, P., Beney, L., & Chambin, O. (2018). Optimized tableting for extremely oxygen-sensitive probiotics using direct compression. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 538(1-2), 14-20. (IF JCR 2018 : 4,213 - Q1)
15. Grangeteau, C., Lepinois, F., Winckler, P., Perrier-Cornet, J.-M., **Dupont, S.**, & Beney, L. (2018). Cell Death Mechanisms Induced by Photo-Oxidation Studied at the Cell Scale in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, 9. (IF JCR 2018 : 4,259 - Q1)
16. Grangeteau, C., Yahou, F., Everaerts, C., **Dupont, S.**, Farine, J.-P., Beney, L., & Ferveur, J.-F. (2018). Yeast quality in juvenile diet affects *Drosophila melanogaster* adult life traits. *SCIENTIFIC REPORTS*, 8. (IF JCR 2018 : 4,011 - Q1)
17. Medeiros, F. G. M., Correia, R. T. P., **Dupont, S.**, Beney, L., & Pedrini, M. R. S. (2018). Curcumin and fisetin internalization into *Saccharomyces cerevisiae* cells via osmoporation : Impact of multiple osmotic treatments on the process efficiency. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY*, 67(4), 363-369. (IF JCR 2018 : 1,805 - Q3)
18. Cavalaro, R. I., da Cruz, R. G., **Dupont, S.**, Bell, J. M. L. N. de M., & Vieira, T. M. F. de S. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *FOOD CHEMISTRY-X*, 4. (IF JCR 2020 : 5,182 - Q1)
19. da Cruz, R. G., Beney, L., Gervais, P., de Lira, S. P., Ferreira de Souza Vieira, T. M., & **Dupont, S.\*** (2019). Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. *FOOD CHEMISTRY*, 277, 698-705. (IF JCR 2019 : 6,306 - Q1)
20. Macedo de Medeiros, F. G., **Dupont, S.**, Beney, L., Roudaut, G., Hoskin, R. T., & da Silva Pedrini, M. R. (2019). Efficient stabilisation of curcumin microencapsulated into yeast cells via osmoporation. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 103(23-24), 9659-9672. (IF JCR 2019 : 3,53 - Q2)
21. Rapoport, A., Golovina, E. A., Gervais, P., **Dupont, S.**, & Beney, L. (2019). Anhydrobiosis : Inside yeast cells. *BIOTECHNOLOGY ADVANCES*, 37(1), 51-67. (IF JCR 2019 : 10,744 - Q1)
22. Bodzen, A., Iaconelli, C., Charriau, A., **Dupont, S.**, Beney, L., & Gervais, P. (2020). Specific Gaseous Conditions Significantly Improve *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli* Survival to Freeze Drying and Rehydration. *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY*, 7(1), 2+.
23. Dupas, S., Neiers, F., Granon, E., Rougeux, E., **Dupont, S.**, Beney, L., Bousquet, F., Shaik, H. A., Briand, L., Wojtasek, H., & Charles, J.-P. (2020). Collisional mechanism of ligand release by

- Bombyx mori JHBP, a member of the TULIP/Takeout family of lipid transporters. *INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 117. (IF JCR 2020 : 4,714 - Q1)
24. Raise, A., **Dupont, S.\***, Iaconelli, C., Caliri, C., Charriau, A., Gervais, P., Chambin, O., & Beney, L. (2020). Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 56(A). (IF JCR 2020 : 3,981 - Q2)
  25. Bodzen, A., Jossier, A., **Dupont, S.**, Mousset, P.-Y., Beney, L., Lafay, S., & Gervais, P. (2021a). Increased Survival of *Lactococcus lactis* Strains Subjected to Freeze-Drying after Cultivation in an Acid Medium : Involvement of Membrane Fluidity. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 59(4). (IF JCR 2021 : 2,33 – Q3)
  26. Bodzen, A., Jossier, A., **Dupont, S.**, Mousset, P.-Y., Beney, L., Lafay, S., & Gervais, P. (2021b). Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC BIOTECHNOLOGY*, 21(1), 66. (IF JCR 2021 : 3,329 - Q3)
  27. **Dupont, S.\***, Fleurat-Lessard, P., Cruz, R. G., Lafarge, C., Grangeteau, C., Yahou, F., Gerbeau-Pissot, P., Abrahão Júnior, O., Gervais, P., Simon-Plas, F., Cayot, P., & Beney, L. (2021). Antioxidant Properties of Ergosterol and Its Role in Yeast Resistance to Oxidation. *ANTIOXIDANTS*, 10(7), 1024. (IF JCR 2021 : 7,675 - Q1)
  28. Guyot, S., Pottier, L., Bertheau, L., Dumont, J., Dorelle Hondjuila Miokono, E., **Dupont, S.**, Ragon, M., Denimal, E., Marin, A., Hallsworth, J. E., Beney, L., & Gervais, P. (2021). Increased xerotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* during an osmotic pressure ramp over several generations. *MICROBIAL BIOTECHNOLOGY*, 14(4), 1445-1461. (IF JCR 2021 : 6,575 - Q1)
  29. Ribert, P., **Dupont, S.**, Roudaut, G., & Beney, L. (2021). Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 105, 6409-6418. (IF JCR 2021 : 5,56 - Q1)
  30. Zoz, F., Guyot, S., Grandvalet, C., Ragon, M., Lesniewska, E., **Dupont, S.**, Firmesse, O., Carpentier, B., & Beney, L. (2021). Management of *Listeria monocytogenes* on Surfaces via Relative Air Humidity : Key Role of Cell Envelope. *FOODS*, 10(9), 2002. (IF JCR 2021 : 5,561 – Q1)
  31. de Andrade, E. W. V., **Dupont, S.**, Beney, L., Hoskin, R. T., & da Silva Pedrini, M. R. (2022a). Osmoporation is a versatile technique to encapsulate fisetin using the probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus*. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 106, 1031-1044. (IF JCR 2021 : 5,56 - Q1)
  32. Lang, E., They, T., Peltier, C., Colliau, F., Adamuz, J., Grangeteau, C., **Dupont, S.\***, & Beney, L. (2022). Ultra-high irradiance (UHI) blue light : Highlighting the potential of a novel LED-based device for short antifungal treatments of food contact surfaces. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 106(1), 415-424. (IF JCR 2021 : 5,56 - Q1)
  33. de Andrade, E.W.V., **Dupont, S.**, Beney, L., da Silva, E.S., Hoskin, R. T., & da Silva Pedrini, M. R. (2022b). Techno-functionality of fisetin-enriched yoghurt fermented with *Lactobacillus acidophilus* bio-capsules produced via osmoporation. *SYSTEMS MICROBIOLOGY AND BIOMANUFACTURING*, 2, 743-749. (Pas d'IF car journal créé en 2021)

34. Phung, T-T-T., Gerometta M., Chanut J., Raise A., Urena M., **Dupont S.**, Beney L. & Karbowiak T. (2022). Comprehensive approach to the protection and controlled release of extremely oxygen sensitive probiotics using edible polysaccharide-based coatings. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 218, 706-719. (IF JCR 2021 : 8,025 – Q1)
35. de Andrade, E. W. V., **Dupont, S.**, Beney, L., Lobo de Souza, M., Hoskin, R. T., & da Silva Pedrini, M. R. (2022c). Sonoprocessing is an effective strategy to encapsulate fisetin into *Saccharomyces cerevisiae* cells. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 106, 7461-7475. (IF JCR 2021 : 5,56 - Q1)
36. Ragon, M., Bertheau, L., Dumont, J., Bellanger, T., Grosselin, M., Basu, M., Pourcelot, E., Horrigue, W., Denimal, E., Marin, A., Vaucher, B., Berland, A., Lepoivre, C., **Dupont S.**, Beney L., Davey, H.M. & Guyot, S. (2023). The Yin-Yang of the Green Fluorescent Protein: Impact on *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B*, 238(112603). (IF JCR 2021 : 6,814 – Q1)
37. They, T., Grangeteau, C., Beney, L., **Dupont, S.**\*(2023). Sporicidal efficiency of an ultra-high irradiance (UHI) near UV/visible light treatment: an example of application to infected mandarins. *FOOD CONTROL*, 147(109568). (IF JCR 2021 : 6,652 – Q1)

**\* Publications en auteur correspondant**

2.2.2. Publication dans des revues scientifiques sans comité de lecture

1. **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Charriau A., Gervais P., Chambin O., Beney L. (2016). Nouvelles stratégies de stabilisation des bactéries extrêmement sensibles à l’oxygène : cas du probiotique *Faecalibacterium prausnitzii*. *STP Pharma pratiques*. 26(2) : 105-107.

2.2.3. Chapitre d’ouvrage

1. **Dupont S. \***, Beney L. (2018). Use of gases in microorganism preservation processes. *Gases in Agro-Food Processes, 1<sup>st</sup> Edition*. Elsevier.

2.2.4. Produits scientifiques à destination de professionnels ou du grand public

1. Beney L., **Dupont S.**, Gervais P. (2012). Maîtrise des activités et de la viabilité microbiennes par le contrôle de l’hydratation. *Industries Alimentaires et Agricoles – Dossier spécial : l’eau dans les aliments N° 11/12 2012*.
2. **Dupont S.**, Beney L., Gervais P. (2013). Conservation à long terme de systèmes biologiques viables et fonctionnels. *Techniques de l’Ingénieur*. Référence F3480
3. **Dupont S.**, Moundanga S., Grangeteau C., Beney L. (2018). Comprendre les moisissures alimentaires pour mieux les contrôler. Vidéo de vulgarisation : <https://www.youtube.com/watch?v=RW4Ru9bHrCs> (36826 vues au 25/07/2023)

4. Valade R., Grangeteau C., Cabeza-Orcel P., Beney L., **Dupont S.**, Martini P. (2021). La lumière à ultra-haute intensité, une technologie émergente. Perspectives agricoles. N° 497 : 60-62.

#### 2.2.5. Communications lors de congrès

1. **Dupont S.**, Thery T., Grangeteau C., Beney L. (2023). Microbial inactivation by the use of ultra high irradiance blue light. International Congress on Engineering and Food (ICEF14). Nantes, France. (communication orale)
2. Guyot S., Zoz F., Grandvalet C., **Dupont S.**, Ragon M., Firmesse O., Beney L. (2023). Control of *Listeria monocytogenes* present on surfaces by managing the Relative Humidity of the air. International Congress on Engineering and Food (ICEF14). Nantes, France. (communication affichée)
3. Ragon M., Belliot G., de Rougemont A., Estienney M., **Dupont S.**, Beney L., Guyot S. (2022). Le bactériophage MS2 : un surrogate du norovirus humain à l'épreuve de procédés de décontamination thermique ou lumineuse à ultra haute intensité ? Congrès de la Société Française de Génie des Procédés. Toulouse, France. (communication orale)
4. **Dupont S.**, Thery T., Grangeteau C., Beney L. (2022). Décontamination microbienne par l'utilisation de la lumière bleue à ultra-haute intensité. Congrès de la Société Française de Génie des Procédés. Toulouse, France. (communication affichée)
5. Beney L., Raise A., Chambin O., **Dupont S.** (2022). Développement et optimisation d'un procédé de production de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène pour leur exploitation industrielle. Congrès de la Société Française de Génie des Procédés. Toulouse, France. (communication affichée)
6. Chambin O., Moundanga S., **Dupont S.**, Allouche R., Zupan N., Muschert S., Beney L. (2022). Soft-tableting: a mean to increase stability of probiotics. 2<sup>nd</sup> edition of the virtual International Conference « Plant productivity and food safety: Soil science, Microbiology, Agricultural Genetics and Food quality ». Torun, Pologne. (communication orale)
7. Thery T., Grangeteau C., Beney L., **Dupont S.** (2021). Lumière bleue à ultra-haute irradiance (UHI) : promesses d'une technologie dans la décontamination microbienne et la préservation d'aliments ?. Microbes - 16<sup>ème</sup> Congrès National de SFM. Nantes, France. (communication affichée)
8. Adamuz J., Denimal E., Grangeteau C., **Dupont S.**, Beney L. (2021). A new method for analysing the dynamics of individual responses in a stressed yeast population by coupling microscopy video sequence acquisition and image analysis. Microbes -16<sup>ème</sup> Congrès National de SFM. Nantes, France. (communication affichée)
9. Ribert P., Beney L., Roudaut G., **Dupont S.** (2021). Understanding the thermal resistance of ADY by differential scanning calorimetry approach. International Conference on Yeast Biotechnology and Biology (ICYBB), distanciel. (communication orale – Prix de la meilleure communication orale)

10. Raise A., **Dupont S.**, Chambin O., Tourdot-Maréchal R., Beney L. (2020). Fermentations innovantes pour l'alimentation du futur. 8èmes Rencontres de l'Institut Carnot Qualiment. Paris, France. (communication orale)
11. Grangeteau C., Adamuz J., Thery T., Lang E., **Dupont S.**, Beney L. (2019). La photo-oxydation par lumière bleue à haute intensité : Une voie prometteuse pour le développement d'un procédé de décontamination microbienne. Congrès de la Société Française de Génie des Procédés. Nantes, France. (communication orale)
12. Raise A., Vaucher B., Jouffrey C., Chambin O., Beney L., Karbowskiak T. and **Dupont S.** (2019). New approach to study the probiotic rehydration and controlled release from encapsulation matrixes thanks to dye. ISOPOW XIV. Dijon, France. (communication affichée)
13. Bodzen A., Jossier A., **Dupont S.**, Mousset P.Y., Beney L., Lafay S., Gervais P. (2019). The growth medium: a critical parameter for lactic acid bacteria survival to freeze-drying. Microbiotec'19. Coimbra, Portugal. (communication orale)
14. Grangeteau C., Thery T., Adamuz J., **Dupont S.**, Beney L. (2019). High-intensive photo-oxidation based on visible light as a promising mean to develop microbial decontamination process. Food And Biosystem Engineering International Conference. Heraklion, Grèce. (communication orale)
15. Raise A., **Dupont S.**, Allouche R., Charriau A., Gervais P., Chambin O. and Beney L. (2019). Tableting: an interesting process to stabilize a probiotic extremely sensitive to oxygen. XVIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP). Nantes, France. (communication orale)
16. Raise A., **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Charriau A., Gervais P., Chambin O., Beney L. (2018). Stratégies d'encapsulation de bactéries probiotiques extrêmement sensibles à l'oxygène. 24ème Forum des Jeunes Chercheurs. Besançon, France. (communication affichée – prix du meilleur poster)
17. Bodzen A., Iaconelli C., Charriau A., **Dupont S.**, Beney L., Gervais P. (2018). Specific gaseous conditions significantly improve *Lactobacillus casei* ATCC334 and *Escherichia coli* K12 survival to freeze-drying. 24ème Forum des Jeunes Chercheurs. Besançon, France. (communication orale)
18. Raise A., **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Charriau A., Gervais P., Chambin O., Beney L. (2018). Stratégies d'encapsulation de bactéries probiotiques extrêmement sensibles à l'oxygène. 39ème congrès du G.F.H.G.N.P. Dijon, France. (communication affichée)
19. **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Raise A., Charriau A., Gervais P., Chambin O., Beney L. (2017). Production et stabilisation de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène : cas du probiotique *Faecalibacterium prausnitzii*. 16ème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Nancy, France. (communication affichée)
20. Raise A., **Dupont S.**, Allouche R., Gervais P., Beney L. and Chambin O. (2019). Comparison of different dosage forms to deliver extremely oxygen-sensitive probiotics. The 3rd European Conference on Pharmaceutics. Bologne, Italie. (communication orale)

21. Verstraeten S., Raise A., Robert V., Gervais P., Julliand V., Chambin O., Jouffrey C., Langella P., **Dupont S.**, Beney L., Thomas M. (2018). The viability and functionality of *F. prausnitzii* strains grown in a new confidential growth medium. 6<sup>th</sup> World Congress on Targeting Microbiota. Porto. Portugal. (communication affichée).
22. Raise A., **Dupont S.**, Allouche R., Gervais P., Beney L., Chambin O. Different Strategies to Stabilize Extremely Oxygen-Sensitive Probiotics. (2018). 3rd International Conference on Agriculture and Agro-Industry. Chiang Rai, Thaïlande. (communication orale)
23. **Dupont S.**, Charriau A., Raise A., Chambin O., Gervais P., Beney L. (2017). Challenges in the large scale production of anaerobic bacteria. Pharmabiotics Global, Paris, France. (communication orale invitée)
24. Allouche R., **Dupont S.**, Charriau A., Gervais P., Beney L., Chambin O. (2017). Stabilization of probiotic sensitive to oxygen by direct compression. 2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics, Cracovie, Pologne. (communication affichée)
25. Raise A., **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Charriau A., Gervais P., Chambin O., Beney L. (2017). Stratégies d'encapsulation de bactéries probiotiques extrêmement sensibles à l'oxygène. 13<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Microbiologie. Paris, France. (communication orale)
26. Chambin O., **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Charriau A., Gervais P., Beney L. (2016). Different Encapsulation Strategies to stabilize Extremely Oxygen-sensitive Bacteria: Case of the Probiotic *Faecalibacterium prausnitzii*. 4<sup>th</sup> Congress on Innovation in Drug Delivery, Antibes-Juan-les-Pins, France. (communication affichée)
27. **Dupont S.**, Lafarge C., Jouffrey C., Cayot P., Gervais P., Beney L. (2016). A New Antioxidant Role for Sterols: the case of Ergosterol. 1<sup>st</sup> International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants, Porto, Portugal. (communication affichée)
28. Gonçalves da Cruz R., Lira S.P., Vieira T.M.S., **Dupont S.**, Beney L. (2016). Use of Wild-type and Mutant of *Saccharomyces cerevisiae* as an Antioxidant Activity Method for Acerola Extract from Brazil. 1<sup>st</sup> International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants, Porto, Portugal. (communication affichée)
29. **Dupont S.**, Iaconelli C., Caliri C., Charriau A., Gervais P., Chambin O., Beney L. (2015). Nouvelles stratégies de stabilisation des bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène : cas du probiotique *Faecalibacterium prausnitzii*. Colloque "Encapsulation/vectorisation de molécules actives", Dijon, France. (communication orale)
30. **Dupont S.**, Lafarge C., Cayot P., Gervais P., Beney L. (2015). The unexpected role of ergosterol in yeast adaptation to hydric fluctuations. ISSY 32 – International specialized symposium on yeasts, Perugia, Italie. (communication orale)
31. **Dupont S.**, Lafarge C., Cayot P., Gervais P., Beney L. (2015). A new antioxidant role for sterols: the case of ergosterol. ISSY 32 – International specialized symposium on yeasts, Perugia, Italie. (communication affichée)

32. **Dupont S.** (2015). Compréhension des mécanismes de résistance de *S. cerevisiae* pour le développement de procédés de maîtrise des contaminations fongiques. Workshop AgroSup Dijon Produire, transformer, commercialiser, distribuer, consommer autrement, Dijon, France. (communication orale)
33. **Dupont S.** (2014). Compréhension des mécanismes de résistance à la déshydratation de *Saccharomyces cerevisiae* : application à la préservation ou la destruction de levures. Colloque Flores Microbiennes d'Intérêt, Dijon, France. (communication orale invitée)
34. **Dupont S.** (2014). L'ergostérol : une molécule clé dans le passage d'une vie aquatique à une vie terrestre chez les champignons. Journée de Rencontre avec les lycéens organisée par Agrale Dijon, Dijon, France. (communication orale)
35. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2014). Lateral reorganization of yeast plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. New Frontiers in Anhydrobiosis, Pornichet, France. (communication affichée)
36. **Dupont S.**, Ferreira T., Cayot P., Gervais P., Beney L. (2014). Key role of ergosterol in yeast adaptation to anhydrobiosis. New Frontiers in Anhydrobiosis, Pornichet, France. (communication orale)
37. Vo-van Q.B., Beney L., **Dupont S.**, Tourdot-Marechal R. (2013). Rôle des stérols dans la réponse à un stress éthanol chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France. (communication affichée)
38. **Dupont S.**, Iaconelli C., Gervais P., Beney L. (2012). Ergosterol-rich microdomains: antioxidative islets in yeast plasma membrane? Dijon Domains, Dijon, France (communication orale)
39. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2012). Role of nature and lateral organization of sterols on the yeast resistance to extreme dehydration. Dijon Domains, Dijon, France (communication affichée)
40. **Dupont S.**, Lemetais G., Ferreira T., Cayot P., Gervais P., Beney L. (2012). Rôle clé de l'ergostérol dans la résistance des levures aux perturbations hydriques. Workshop Microbiologie - Interactions des microorganismes avec leurs environnements : circulation, adaptation, Dijon, France (communication orale invitée)
41. **Dupont S.**, Lemetais G., Ferreira T., Cayot P., Gervais P., Beney L. (2012). The key role of ergosterol in the resistance of yeasts to water stress. Microbial Stress : From Molecules to Systems, Belgirate, Italie. (communication orale)
42. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2012). Lateral reorganization of yeast plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. Microbial Stress : From Molecules to Systems, Belgirate, Italie. (communication affichée - 3<sup>ème</sup> prix de la meilleure communication affichée du congrès)

43. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2011). Rôle de l'ergostérol dans la résistance des levures à la déshydratation. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France. (communication orale - Prix de la meilleure communication orale de la section Microbiologie-Alimentation)
44. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2011). Role of Sterol Organization and Nature on the Resistance of Yeast to Extreme Dehydration. 1<sup>st</sup> International CIGR Workshop on Food Safety: Advances and Trends, Dijon, France. (communication affichée)
45. Beney L., **Dupont S.**, Gervais P. (2011). Influence of Hydration Changes on the Resistance of Microorganisms: Implication in the Decontamination of Dried Foods. 1<sup>st</sup> International CIGR Workshop on Food Safety: Advances and Trends, Dijon, France. (communication orale)
46. Beney L., **Dupont S.**, Gervais P. (2010). Dehydration rate affects membrane lateral organization and yeast survival. Patchy Prague - Workshop on Plasma Membrane Domains in Fungi and Plants, Prague, République Tchèque. (communication orale)
47. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2010). Kinetic of dehydration affects lateral membrane organization and cell survival. XXIIème Congrès de la Société Française de Biophysique, La Colle sur Loup, France. (communication affichée)
48. Beney L., **Dupont S.**, Simonin H., Gervais P. (2010). Impact of simultaneous thermal and osmotic treatments on plasma membrane and the survival of yeast. XXIIème Congrès de la Société Française de Biophysique, La Colle sur Loup, France. (communication affichée)
49. **Dupont S.**, Lemetais G., Gervais P., Beney L. (2010). Impact de la cinétique de déshydratation sur la membrane plasmique de la levure *S. cerevisiae*. Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France. (communication orale)
50. Lemetais G., **Dupont S.**, Molimard P., Courau S., Beney L., Gervais P. (2010). Optimisation de la déshydratation d'une souche probiotique. Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France. (communication affichée)
51. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2009). Relation entre la survie cellulaire et les modifications membranaires lors de déshydratations extrêmes : optimisation de stratégies de conservation cellulaire. XIIème congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Marseille. (communication affichée)
52. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2009). Impact de la déshydratation extrême sur la dynamique membranaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Journée de Présentation Dijon Imagerie Cellulaire, Dijon, France. (communication orale)
53. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2009). Implication de la membrane plasmique dans la survie et la mort de la levure lors d'une perturbation hydrique. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France. (communication orale)
54. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2009). Cell survival to severe dehydration is related to maintain of membrane integrity: application to optimization of preservation strategies of microorganisms. European Drying Conference AFSIA, Lyon. (communication affichée)
55. **Dupont S.**, Gervais P., Beney L. (2008). Implication de la membrane plasmique dans la survie et la mort de la levure lors d'une perturbation hydrique. Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France. (communication affichée)

#### 2.2.6. Brevets et savoir-faire secret

1. Savoir-faire secret LELISTA (2017) : Protocole de production de suspensions microbiennes à l'état liquide avec longues durées de conservation. Savoir-faire déposé à la SATT-Grand Est (SAYENS). Exploitation par Licence exclusive par le Centre Œnologique de Bourgogne (Beaune).
2. Brevet d'invention (FR3084262B1) (2021) : Procédé d'élimination de micro-organismes présents dans et/ou à la surface d'un matériau à décontaminer. Exploitation par licence par la société Pholia (Brevet étendu à l'international (EP3829654A1 et WO2020020591A1)).
3. Brevet d'invention (FR3108122A1) (2021) : Milieu de culture alimentaire. Ce brevet décrit l'utilisation d'un milieu de culture de qualité alimentaire pour la production de bactéries lactiques destinées à une utilisation alimentaire ou pharmaceutique.
4. Brevet d'invention (FR3118059A1) (2022) : Milieu de culture, procédé de fabrication et procédé de culture bactérienne. Ce brevet décrit la fabrication d'un milieu et les conditions de culture pour la production de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène (Brevet étendu à l'international (WO2022129616A1)).

## 2.3. Activités scientifiques annexes

### 2.3.1. Activités d'expertise scientifique

- 2017 : Évaluation d'un projet ECOS (Évaluation-orientation de la Coopération Scientifique) – Programme de coopération et de partenariat scientifique France-Mexique.
- 2018 : Évaluation d'un projet ECOS (Évaluation-orientation de la Coopération Scientifique) – Programme de coopération et de partenariat scientifique France-Mexique.
- 2022 : Expertise dossiers BQR 2022 - Recherche en Réseau
- 06/2022 : Expertise projet MITACS Accélération (Canada)
- 05/2023 : Expertise projet MITACS Accélération (Canada)

### 2.3.2. Membre de comité de thèse et chercheur référent de l'école doctorale

- 2016-2020 : Membre du comité de thèse de Daniel ZAVALA ORTIZ (Université de Lorraine, École doctorale SIMPPE - SCIENCES ET INGENIERIES DES MOLECULES, DES PRODUITS, DES PROCÉDES ET DE L'ÉNERGIE)
- 2016-2018 : Membre du comité de thèse de Li MENGGAO (Université de Lorraine, École doctorale SIMPPE - SCIENCES ET INGENIERIES DES MOLECULES, DES PRODUITS, DES PROCÉDES ET DE L'ÉNERGIE)
- Depuis 2016 : Chercheur référent pour des doctorants de l'école doctorale Environnements-Santé de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

### 2.3.3. Activité éditoriale

- Membre du comité éditorial du journal Foods, section Food Microbiology
- Reviewers dans Food Microbiology, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Foods, Cell Biology International, Frontiers in Genetics, Food Control, Applied and Environmental Microbiology.

## 2.4. Activités pédagogiques

### 2.4.1. Contexte d'exercice de l'activité d'enseignement

Concernant mon activité d'enseignement depuis mon recrutement comme Maître de Conférences à AgroSup Dijon, j'appartiens au département des Sciences de l'Ingénieur et des Procédés (DSIP). AgroSup Dijon devenue l'Institut Agro Dijon en 2022 est une école d'ingénieur qui dispense un enseignement autour des sciences agronomiques et des sciences des aliments. L'enseignement de l'Institut Agro Dijon repose sur quatre départements qui chacun d'eux comporte plusieurs Unités Pédagogiques (UP) (Figure 1).



Figure 1. Structure et organisation des départements d'enseignement de l'Institut Agro Dijon.

Mon poste de Maître de Conférences est rattaché à l'UP Génie des Procédés Alimentaires. J'enseigne cependant également dans l'UP Base de Génie des Procédés.

### 2.4.2. Volumes, répartition des différents types d'enseignement et publics concernés

Depuis mon recrutement, mon service d'enseignement a sensiblement évolué au cours des années (Figure 2). Il a augmenté entre 2016 et 2018 pour atteindre 309 hTD puis a ensuite diminué autour de 250 hTD suite à une demande de ma part pour pouvoir retrouver plus de temps à consacrer à la recherche.

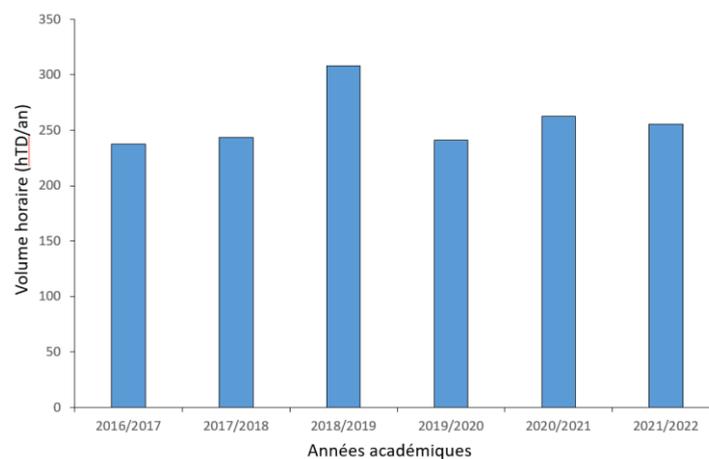


Figure 2. Évolution du volume de mon service d'enseignement sur la période 2016-2022.

Mon enseignement comporte des cours magistraux, des travaux dirigés et des travaux pratiques. Depuis le début de ma carrière, la part dédiée aux travaux pratiques se réduit en faveur des cours magistraux et des travaux dirigés. Mon service d'enseignement est complété par différentes activités telles que le suivi d'étudiants en stage et la participation à des jurys. Depuis 2018, 30 h équivalent TD (hTD) sont intégrées à mon service d'enseignement pour la coordination de la formation d'ingénieur agro-alimentaire par apprentissage de l'Institut Agro Dijon. La répartition entre les différents types d'enseignement sur la période 2016-2021 est présentée dans la Figure 3

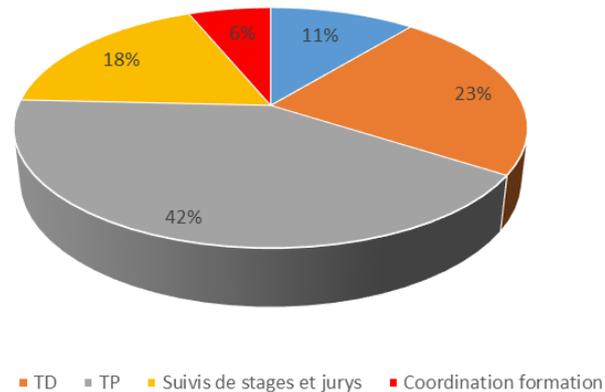


Figure 3. Répartition de mon service d'enseignement sur la période 2016-2022.

Mon enseignement est principalement réalisé dans les formations d'ingénieur de l'Institut Agro Dijon. À titre d'exemple, sur l'année universitaire 2021/2022, environ 90% de mon service réalisé face à des étudiants concernait ces formations. Les 10% restants concernaient des enseignements réalisés en Master 1 Nutrition et Sciences des Aliments (Université de Bourgogne) et dans le Master 2 international *Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes* (MP<sup>2</sup>) (Tableau 1).

Tableau 1. Enseignements dispensés face aux étudiants pour l'année 2021/2022. Dans les intitulés de formation, 1A et 2A correspondent aux étudiants ingénieurs de 1ère et 2ème année, respectivement.

Formation	Enseignement	Volume horaire (hTD)	Effectif	Type d'enseignement
Formation Ingénieur sous statut étudiant 1A	Thermodynamique	12	220	CM
Formation Ingénieur sous statut apprenti 1A	Thermodynamique	12	20	CM
Master 2 recherche MP <sup>2</sup>	<i>Food Processes and Emerging Technologies</i>	9	8	CM
Formation Ingénieur sous statut étudiant 1A	Thermodynamique	48	220 (≈25/groupe de TD)	TD
Formation Ingénieur sous statut apprenti 1A	Thermodynamique	8	20	TD
Master 1 Nutrition et Sciences des Aliments	Génie des Procédés	8	52 (26/groupe de TD)	TD
Formation Ingénieur sous statut étudiant 2A	Opérations unitaires du génie des procédés alimentaires	48	220 (6 étudiants/groupe de TP)	TP
Formation Ingénieur sous statut apprenti 2A	Opérations unitaires du génie des procédés alimentaires	16	20 (5 étudiants/groupe de TP)	TP
Formation Ingénieur sous statut apprenti 1A	Thermodynamique	16	20 (5 étudiants/groupe de TP)	TP

#### 2.4.3. Gestion et animation de l'enseignement

Différentes missions collectives en lien avec l'enseignement m'ont été confiées depuis mon recrutement comme Maître de Conférences. Les principales missions sont listées ci-dessous :

- Depuis septembre 2016 : Responsable du module d'enseignement de thermodynamique à AgroSup Dijon puis à l'Institut Agro Dijon
- Depuis septembre 2017 : Responsable de l'unité d'enseignement « *Food Processes and Emerging Technologies* » dans le Master recherche international MP<sup>2</sup>
- Depuis septembre 2018 : Coordonnateur de la formation Ingénieur agro-alimentaire par apprentissage AgroSup Dijon puis à l'Institut Agro Dijon.

## **3. Activités de recherche**

### 3.1. Introduction

Il y a environ 3,5 milliards d'années, les premières formes de vie se développaient sur Terre. L'analyse des plus anciens fossiles retrouvés a révélé que ces formes de vie étaient alors exclusivement aquatiques et consistaient en des micro-organismes. La capacité d'évolution rapide, de par des taux de mutation importants et le transfert horizontal de gènes, a permis aux micro-organismes de coloniser ensuite une grande variété de niches écologiques de notre planète. La famille des hominidés à laquelle appartient l'Homme moderne est apparue bien plus tard, il y a environ 9 millions d'années. L'évolution de l'Homme vers *Homo sapiens* ne s'est pas déroulée en parallèle de celle du monde microbien mais dans une intime interaction. En effet, les micro-organismes ne sont pas seulement des acteurs du monde qui nous entoure mais certains, dits « commensaux », sont aussi hébergés par notre corps. L'accroissement des connaissances sur les micro-organismes commensaux a permis de mettre en évidence le rôle du microbiote dans diverses fonctions métaboliques de l'Homme (Jandhyala et al. 2015). Cette relation n'est cependant pas à sens unique puisque l'environnement créé par l'hôte affecte le microbiote. Ces connaissances ont permis de proposer le concept de *Chosmo sapiens*, selon lequel l'Homme moderne a co-évolué depuis ses origines avec le monde microbien avec lequel il est indéfectiblement lié.

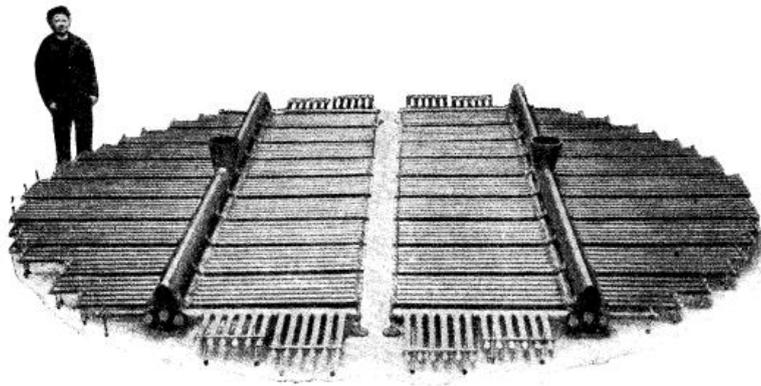
La prise de conscience du monde microbien par l'Homme est finalement un événement récent à l'échelle de cette interaction originelle. Elle est principalement reliée aux travaux scientifiques réalisés à la fin du XVII<sup>ème</sup> siècle par Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) qui, par ses contributions sur l'amélioration des premiers microscopes, a observé et décrit des micro-organismes pour la première fois. Ce n'est cependant que 200 ans plus tard, avec notamment les travaux de Robert Koch (1843-1910) et Louis Pasteur (1822-1895), qu'ont été mis en évidence l'implication de ces micro-organismes comme agents de certaines maladies mais aussi comme agents de la fermentation des aliments. De ces découvertes sont nées les premières recherches visant à développer des technologies de maîtrise des populations microbiennes. Ces technologies consistent en des procédés d'inactivation pour les micro-organismes d'altération ou pathogènes et en des procédés de production pour les micro-organismes d'intérêt.

#### 3.1.1. Procédés de production et de stabilisation de micro-organismes

Les micro-organismes d'intérêt comprennent les micro-organismes qui, par leurs activités métaboliques et leurs interactions avec d'autres organismes, présentent des bénéfices pour l'Homme et l'environnement. La production en bioréacteur de micro-organismes d'intérêt remonte au début du XX<sup>ème</sup> siècle. La première fermentation bactérienne réalisée en bioréacteur contrôlé a été réalisée en 1916 par Chaim Weizmann (1874-1952) dans le but de produire de l'acétone qui était alors utilisée pour la fabrication d'explosifs (Nguyen et al. 2018). Des réacteurs à plus grande échelle intégrant des systèmes d'aération ont ensuite été construits pour produire

des levures pressées (Becze and Liebmann 1944) (Figure 4). De nos jours, la capacité des réacteurs a augmenté jusqu'à des volumes pouvant aller jusqu'au million de litres.

## AERATION in the PRODUCTION of COMPRESSED YEAST



The photograph shows an aerating system of the perforated tube type for a huge propagating tub, where compressed yeast is produced by aeration in a European factory.

*George de Becze and A. J. Liebmann*

SHENLEY RESEARCH INSTITUTE, LAWRENCEBURG, IND.

Figure 4. Représentation du système d'aération, développé par Becze et Liebmann, utilisé pour la production de levures à grande échelle (Becze and Liebmann 1944).

Bien que la production de biomasse soit une étape clé dans l'utilisation industrielle de micro-organismes d'intérêt, elle n'est cependant généralement pas la seule. En effet, la viabilité des micro-organismes ne se maintient pas dans le temps si des procédés de préservation ne sont pas mis en œuvre pour les stabiliser après leur production. La volonté de conserver des micro-organismes est apparue lors de la création des premières collections de souches de micro-organisme, notamment à celles de l'Institut Pasteur et de l'American Type Culture Collection créées respectivement en 1887 et 1911. Initialement, le maintien de ces souches de collection reposait sur leur repiquage régulier et fastidieux. Selon Jean Binot (1867-1909) alors curateur de la collection de l'Institut Pasteur, cette méthode pouvait cependant échouer par contamination ou dans les cas où les générations successives aboutissaient à une forme trop « dénaturée » du micro-organisme (Gallay-Keller 2021). Cela incita Binot à rechercher des conditions de milieu conduisant à une « vie latente » qui pourrait permettre de maintenir les souches sans avoir à appliquer la technique de repiquage. Claude Bernard (1813-1878), dans les *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux* (1878), a décrit quelques années plus tôt une forme de « vie latente » qui peut s'observer chez certains animaux (tardigrades, rotifères...), végétaux (graines) et ferments (levures) dans leur environnement naturel. Ces observations n'étaient cependant pas les premières puisque Leeuwenhoek et Lazzaro Spallanzani (1729-1799), entre autres, avaient réalisé des observations similaires. Il fut cependant le premier à définir la « vie latente » comme un « état d'indifférence chimique » qu'il définit comme « la rupture des relations entre l'être et le milieu, qui restent en face l'un de l'autre, inaltérables et

inaltérés ». Les connaissances décrites par Bernard ont probablement nourri la réflexion de Binot dans la recherche de conditions conduisant à cet état de « vie latente ». Vers la fin de sa vie, Binot avait mis en place des techniques de dessiccation (pour des formes sporulées de micro-champignons) et des milieux « neutralisants ». Ces milieux correspondaient à des milieux pauvres en nutriments permettant de stopper le développement des micro-organismes mais assurant tout de même leur maintien.

L'étude du froid pour la conservation de cellules et tissus biologiques trouve son origine au XVII<sup>ème</sup> siècle dans les travaux de Robert Boyle (1627-1691). Dans son étude *New Experiments and Observations Touching Cold* (1683), il s'intéresse aux effets de températures négatives sur différents animaux. Il pensait alors que certains animaux pouvaient survivre à un cycle de congélation-décongélation si l'étape de décongélation était menée doucement. En 1776, Spallanzani observe que des spermatozoïdes peuvent conserver leur mobilité après avoir été placés dans la neige (Sztein et al. 2018). L'utilisation du froid pour la conservation de cellules biologiques prend son véritable essor à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle au travers de travaux sur des globules rouges et des spermatozoïdes. Ces travaux ne conduisaient cependant qu'à des taux de survie cellulaire très faibles. C'est seulement dans les années 50 où la compréhension des phénomènes cellulaires létaux, notamment les effets des perturbations osmotiques induites par la congélation sur les membranes cellulaires, et l'utilisation de cryoprotectants tels que le glycérol (Lovelock and Polge 1954) ou le DMSO (Lovelock and Bishop 1959) que la congélation a permis de conserver avec succès des cellules biologiques d'intérêt, dont des micro-organismes.

Depuis la mise en œuvre des premières méthodes utilisées pour stabiliser les micro-organismes, de nombreux travaux ont cherché à identifier les mécanismes cellulaires permettant la stabilité à long terme de cellules biologiques. Que ce soit par le biais de la congélation ou la dessiccation, le mécanisme principal de la conservation de cellules biologiques repose sur la vitrification du milieu intracellulaire (Sun and Leopold 1997). L'état vitreux correspond à un état solide amorphe dans lequel la diffusion des molécules et les réactions chimiques sont fortement ralenties. Contrairement à l'état solide cristallisé qui impose une réorganisation structurale des composants de la matrice conduisant à une altération des structures cellulaires, l'état vitrifié permet de préserver au mieux ces structures. Les procédés de préservation actuels, par la mise en œuvre de transferts d'énergie (apport ou extraction de chaleur) couplés à des transferts de matière (déshydratation), permettent d'atteindre cet état vitrifié (Dupont et al. 2013). Les principaux procédés utilisés dans la stabilisation sont présentés dans la Figure 5.

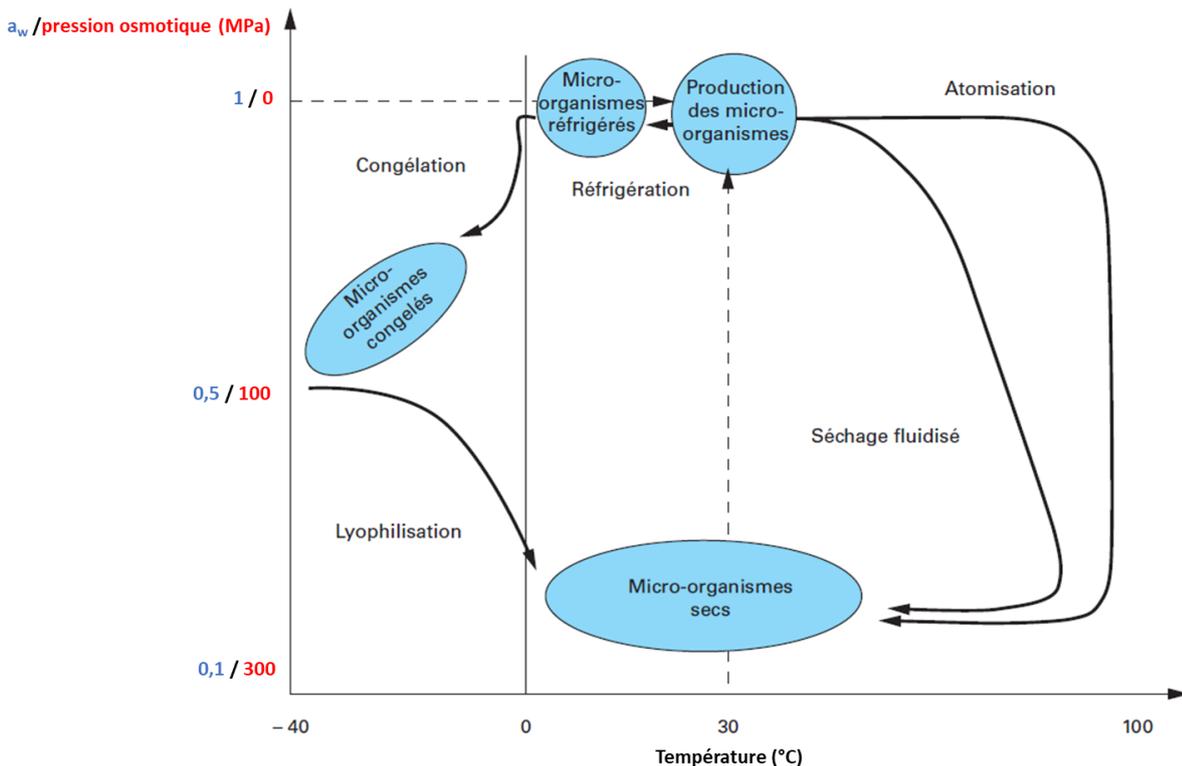


Figure 5. Schéma des fluctuations hydriques (activité de l'eau / pression osmotique) et thermiques des micro-organismes au cours de différents procédés de préservation de micro-organismes (adapté de Beney 2010; Dupont et al. 2013).

### 3.1.2. Procédés d'inactivation des micro-organismes

À l'opposé des micro-organismes bénéfiques définis au début du paragraphe précédent, d'autres micro-organismes impactent négativement l'Homme et ses activités. Avant l'observation par microscopie au XIX<sup>ème</sup> siècle de ces micro-organismes, les expériences de Spallanzani (1765) visant à réfuter la théorie de la génération spontanée ont été les premières à montrer qu'un traitement thermique (ébullition) d'un milieu nutritif à base d'extraits de viande placé dans un récipient fermé était stabilisé alors que le même milieu non traité était transformé par des germes. Plus tard, en 1795, Nicolas Appert (1749-1841) développa empiriquement l'appertisation, premier procédé de traitement thermique d'aliments dans des bouteilles ou bocaux qui permettait de stabiliser leurs qualités organoleptiques sur des durées prolongées, notamment en vue de leur transport. 60 ans plus tard, Pasteur décrira le principe scientifique de l'influence de la chaleur sur la qualité microbiologique des aliments. Il déposa en 1865 un brevet pour un procédé de conservation du vin par chauffage qui sera communément appelé pasteurisation. Des dispositifs permettant de transférer la chaleur au vin seront rapidement imaginés (Figure 6) et la pasteurisation sera ensuite appliquée à d'autres matrices alimentaires.

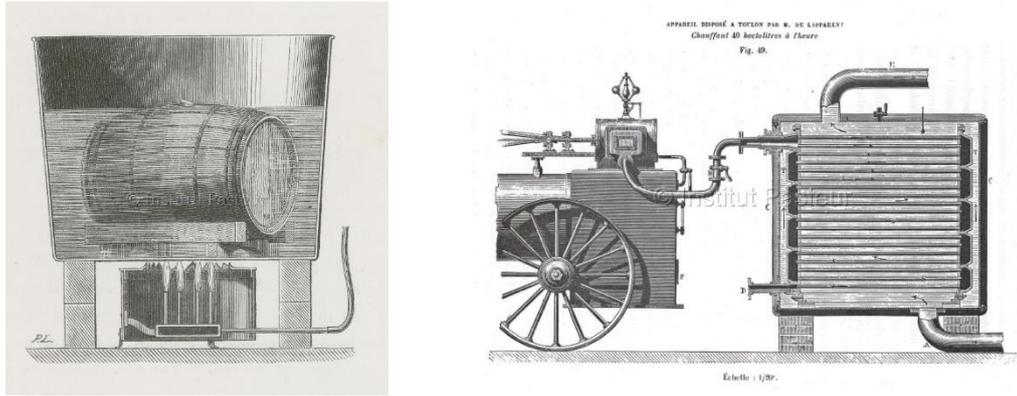


Figure 6. Exemples des premiers dispositifs permettant la pasteurisation du vin (Institut Pasteur).

Quelques années plus tard, les spores bactériennes, formes de résistance à la chaleur de certaines bactéries, sont décrites par Koch et Ferdinand Cohn (1828-1898) (Setlow and Johnson 2012). Dans la suite de cette description, John Tyndall (1820-1893) développera en 1876 la tyndallisation, procédé permettant de détruire ces spores, à l'aide d'une alternance entre des phases de chauffage à une température modérée (60 à 70 °C) et des retours à température ambiante. Le principe de ce procédé repose sur l'induction de la germination des spores perdant leur capacité de résistance à la chaleur par le biais de ce type de traitement thermique. Les formes végétatives sont formées pendant le retour à température ambiante et sont ensuite inactivées lors du chauffage suivant. Ces alternances sont répétées plusieurs fois pour obtenir un traitement efficace.

Le développement des procédés d'inactivation par l'utilisation de chaleur s'est poursuivi jusqu'à notre époque en suivant les évolutions techniques et le développement de dispositifs permettant une optimisation des transferts de chaleur (température atteinte, vitesse de transfert, homogénéité) aux aliments ou à des matériaux à décontaminer. La caractérisation de l'influence du niveau de température sur les cinétiques de destruction microbienne a permis de mettre en place différents barèmes « Temps/Température » applicables actuellement pour la décontamination des aliments au travers de la pasteurisation et de la stérilisation. La pasteurisation permet l'inactivation des micro-organismes à l'exception des formes sporulées et est adaptée pour les aliments présentant un pH inférieur à 4, valeur seuil de pH en dessous de laquelle les spores ne peuvent germer et se développer. La pasteurisation repose sur l'application de traitements thermiques modérés ou de températures élevées sur des temps très courts. La stérilisation permet d'inactiver l'ensemble des micro-organismes, y compris les spores. La stérilisation peut s'effectuer par tyndallisation ou par l'utilisation de températures très élevées.

Bien qu'efficaces et largement utilisés, les procédés thermiques d'inactivation microbienne ne peuvent cependant être appliqués à tous les types d'aliments et peuvent conduire à une dégradation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Des alternatives ont donc été recherchées afin d'assurer la qualité microbiologique des aliments. Parmi ces alternatives se

trouvent principalement les hautes pressions, les rayonnements électromagnétiques (UV, gamma) ou bien encore l'utilisation de molécules chimiques.

Les mécanismes létaux des procédés et techniques utilisés pour inactiver les micro-organismes reposent sur l'altération des structures et des macromolécules cellulaires conduisant à une perte d'activité et à la mort des micro-organismes. La membrane plasmique des micro-organismes, de par sa position à l'interface entre le milieu intracellulaire et l'environnement extérieur, est une des cibles majeures des traitements de décontamination.

La membrane plasmique est composée de lipides disposés en double feuillet et de protéines. La membrane plasmique des micro-organismes est associée à une structure plus externe, la paroi, dont la composition et la structure varie en fonction du type de micro-organismes (Figure 7). Au-delà du rôle de barrière liée à son hemi-perméabilité (perméabilité à l'eau mais pas aux solutés), la membrane plasmique intervient dans une variété de processus biologiques indispensables au métabolisme cellulaire tels que les phénomènes de transport, la transduction de signaux ou encore les processus de conversion d'énergie (van der Rest et al. 1995). La viabilité des micro-organismes repose donc sur l'intégrité de cette structure.

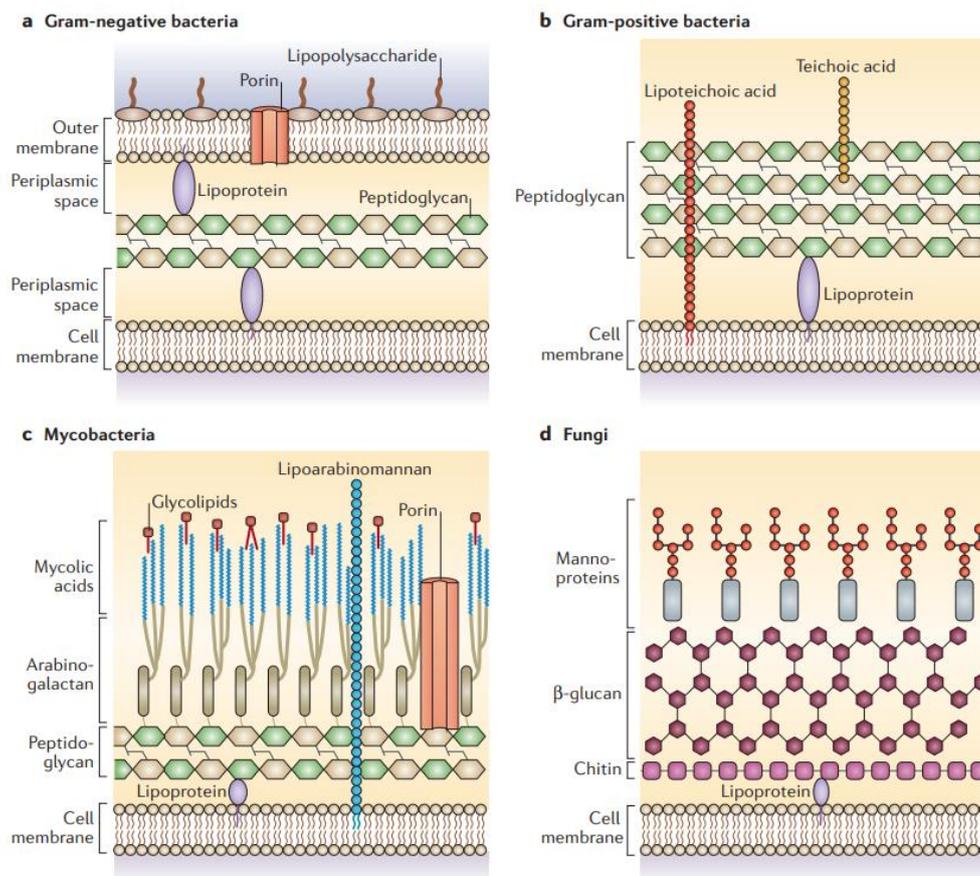


Figure 7. Structure de la paroi cellulaire de bactéries Gram positif (a), de bactéries Gram négatif (b), de mycobactéries (c) et de champignons incluant les levures (d) (Brown et al. 2015).

### 3.1.3. Développement actuel et optimisation des procédés microbiologiques

Bien que les procédés microbiologiques aient considérablement évolué depuis la découverte des micro-organismes, la recherche dans ce domaine est toujours très active dans le but d'optimiser des procédés existants ou de développer des nouveaux procédés permettant de répondre à de nouveaux enjeux et à de nouvelles attentes sociétales.

#### *3.1.3.1. Production et stabilisation de micro-organismes d'intérêt*

Concernant les micro-organismes bénéfiques, bien que les conditions de production industrielle soient maîtrisées pour une partie d'entre eux, ces conditions n'ont pas encore été définies pour d'autres. C'est notamment le cas pour les micro-organismes qui ont été découverts et caractérisés récemment, comme par exemple la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*. *F. prausnitzii* est une bactérie commensale du tube digestif humain présentant un fort potentiel probiotique notamment grâce à ses effets anti-inflammatoires (Sokol et al. 2008). Cette bactérie est extrêmement sensible à l'oxygène et ne pouvait, avant les travaux réalisés au sein de l'UMR PAM, se cultiver qu'en petits volumes dans des milieux non adaptés à une utilisation industrielle (taux de croissance faible et milieu non réglementaire pour une ingestion de la bactérie). Pour ces micro-organismes d'intérêt, il y a donc un travail de recherche à mener afin de mieux comprendre leur métabolisme et leur résistance à des perturbations externes afin de définir des conditions de production (milieux, paramètres physico-chimiques) et de développer des équipements spécifiques à ces souches. Il a actuellement été recensé 5,6 millions d'espèces de micro-organismes par les chercheurs mais il est cependant estimé que ce chiffre ne représenterait que 0,001% de toutes les espèces microbiennes présentes sur Terre (Locey and Lennon 2016). La production de nouveaux micro-organismes d'intérêt, que ce soit pour les domaines de la santé, de l'agro-alimentaire ou de l'environnement, représente donc un enjeu important pour l'utilisation future de ces micro-organismes.

Un fois produite, la biomasse microbienne doit être stabilisée pour être viable et fonctionnelle lors de son utilisation future. La déshydratation est une technique de choix pour stabiliser les micro-organismes puisqu'elle permet ensuite de les stocker et les transporter à température ambiante. Cependant, la déshydratation est une perturbation cellulaire pouvant endommager les cellules, notamment leur membrane plasmique, et conduire à leur mort (Simonin et al. 2007). Les taux de survie et les durées de stockage dans un état viable dépendent du type de micro-organismes. La faible résistance de certains micro-organismes présentant un potentiel applicatif important est souvent un verrou à leur utilisation. L'étude de micro-organismes résistants, comme la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, est intéressante pour comprendre les mécanismes cellulaires permettant à un micro-organisme de résister à la déshydratation. Cette compréhension se révèle cruciale pour ensuite définir des conditions physico-chimiques et des paramètres opératoires des procédés de préservation pour optimiser la survie de micro-organismes d'intérêt sensibles.

### *3.1.3.2. Procédés d'inactivation microbienne*

Les procédés de décontamination microbienne sont de nos jours incontournables des domaines médical et agro-alimentaire. Concernant le domaine agro-alimentaire, ces procédés permettent d'inactiver des micro-organismes pathogènes mais aussi des micro-organismes d'altération des aliments. Pour les aliments transformés, les procédés thermiques sont actuellement les plus utilisés. Ces procédés impactent cependant certains attributs de la qualité des aliments. Quant aux aliments bruts ou peu transformés, la maîtrise des contaminations microbiennes passe par des étapes de lavage, l'utilisation du froid et l'emploi d'emballages dans lesquels l'atmosphère peut être contrôlée. Ces solutions ne sont cependant parfois pas suffisantes et des molécules chimiques antifongiques et bactéricides sont utilisées depuis la production jusqu'à la distribution des aliments bruts. L'utilisation de ces molécules induit cependant des problèmes environnementaux et toxicologiques importants. De plus, à l'image de la croissance forte du marché des produits biologiques, les consommateurs sont à la recherche de produits faiblement traités et prêts à consommer.

Dans ce contexte, de nombreux travaux de recherche visent actuellement à développer des stratégies et des procédés d'inactivation microbienne non thermiques qui soient respectueux des matrices alimentaires traitées mais aussi de l'environnement et des consommateurs (Jan et al. 2017). Ce développement s'appuie sur l'évolution de technologies déjà existantes mais aussi sur la mise en œuvre de variables/perturbations peu considérées dans des applications de décontamination. Par exemple, la déshydratation utilisée principalement pour stabiliser les micro-organismes peut être envisagée comme un moyen d'inactivation microbienne lorsqu'elle est appliquée selon des modalités (cinétiques, amplitudes) particulières (Zoz et al. 2016). Les travaux portant sur la compréhension des mécanismes cellulaires conduisant à la mort des micro-organismes lors de perturbations technologiques sont également indispensables pour le développement de ces procédés. Une majorité de travaux de la littérature ont étudié les effets de l'amplitude des perturbations sur les cellules mais peu de travaux ont cherché à comprendre l'effet de la cinétique avec laquelle la perturbation est appliquée. Cette cinétique conditionne pourtant les flux de matière et d'énergie qui s'opèrent entre les cellules et leur environnement et influe la survie des micro-organismes aux perturbations.

## 3.2. Environnement, thématiques et stratégie de recherche

### 3.2.1. Environnement de recherche

Mes travaux de recherche sont réalisés au sein de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM). Cette UMR est placée sous la gestion conjointe de l'Institut Agro Dijon (anciennement AgroSup Dijon) et de l'Université de Bourgogne. La démarche scientifique de l'UMR PAM, dirigée par le Pr Laurent Beney, vise à comprendre les phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui déterminent la qualité des aliments pour développer de nouveaux aliments et de nouveaux procédés alimentaires. La structure de l'UMR est présentée dans la Figure 8. L'UMR est constituée de 4 équipes complémentaires d'un point de vue disciplinaire. Quatre axes transversaux de recherche existent également afin de favoriser les collaborations entre les différentes équipes de l'UMR.

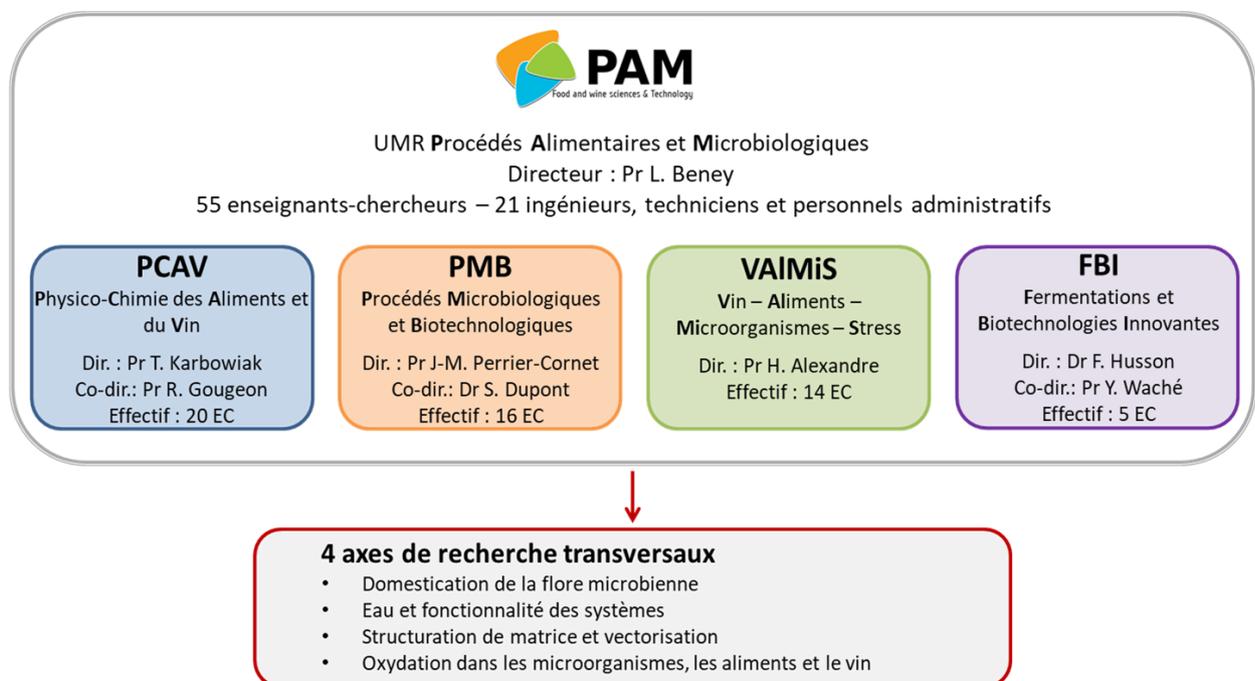


Figure 8. Structure et organisation de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques.

Au sein de l'UMR, je travaille plus précisément dans l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques (PMB dirigée par le Pr Jean-Marie Perrier-Cornet) dont je suis actuellement le co-directeur depuis 2018. L'équipe PMB est principalement localisée au sein d'un des bâtiments de l'Institut Agro Dijon et est constituée d'enseignants-chercheurs de différentes disciplines : microbiologie, virologie, biologie moléculaire et cellulaire, biophysique, génie des procédés microbiologique, informatique, automatisme et mathématiques appliquées. Ces compétences sont mises en œuvre pour comprendre et caractériser la réponse de micro-organismes à des perturbations technologiques (déshydratation, basses et hautes températures, hautes pressions, champs électriques, rayonnements). Ces perturbations peuvent être rencontrées par des micro-

organismes dans des environnements naturels mais les amplitudes ainsi que les vitesses de variation des variables impliquées sont généralement beaucoup plus grandes dans le cas de procédés technologiques. Les réponses étudiées comprennent ainsi des activations et répressions métaboliques mais aussi des réponses passives (morphologiques, structurales...), notamment pour les perturbations intenses pour lesquels le métabolisme cellulaire n'est plus détectable. La connaissance des réponses cellulaires est ensuite utilisée pour développer des procédés de maîtrise de la viabilité et de la fonctionnalité de micro-organismes.

### 3.2.2. Thématique, stratégie et questions de recherche

A l'instar des travaux de recherche menés dans l'équipe PMB, mes travaux s'inscrivent dans une stratégie reposant sur des objectifs scientifiques associés à des questions fondamentales. Ces travaux permettent ensuite de développer des procédés de maîtrise des micro-organismes. Le développement de réacteurs originaux d'application de perturbations cellulaires fait également partie de cette stratégie (

Figure 9).

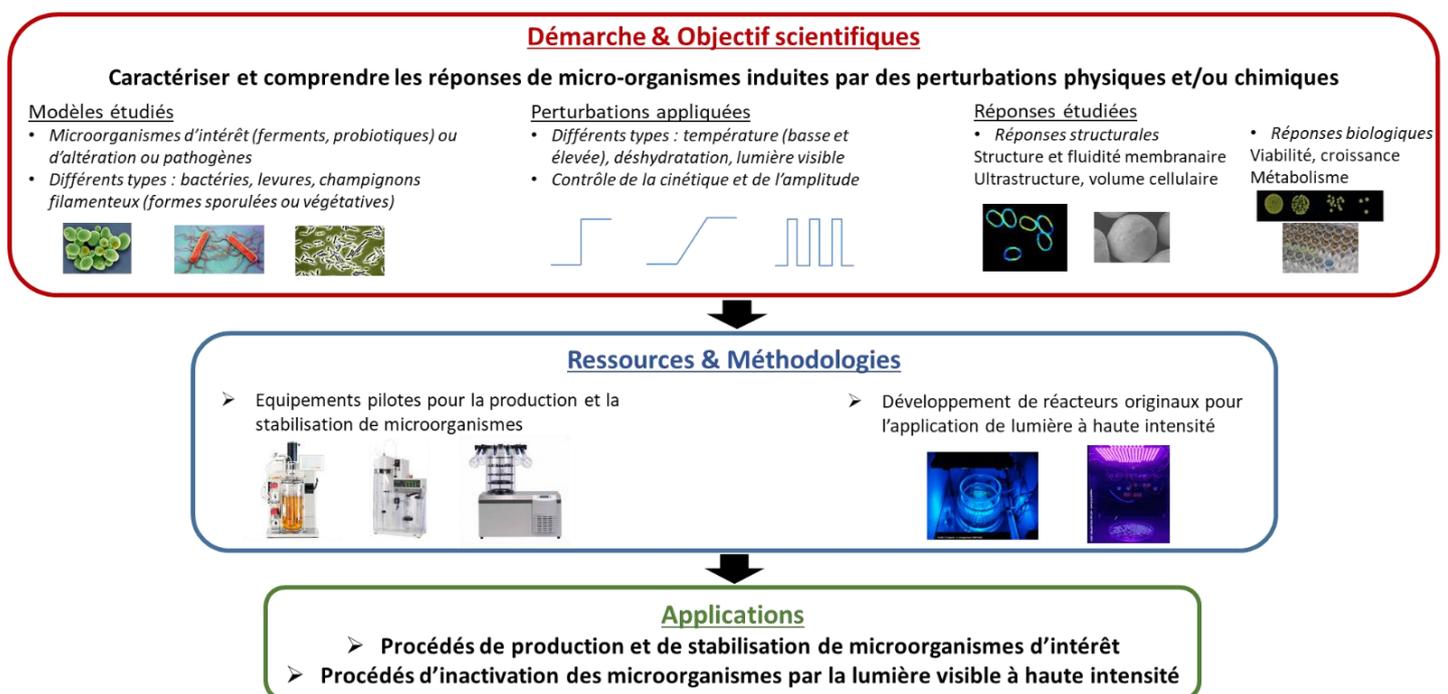


Figure 9. Schéma de la stratégie de recherche menée.

Plus précisément, la stratégie de recherche que je mène repose sur la recherche de mécanismes cellulaires fondamentaux permettant de comprendre les bases de la résistance et de la sensibilité de micro-organismes à des perturbations technologiques et environnementales. Les travaux consistent à appliquer des perturbations contrôlées (cinétique, amplitude, application continue ou sous forme de cycles) sur différents types de micro-organismes (bactéries, levures et

champignons filamenteux) à différents stades physiologiques (spores ou formes végétatives). L'effet des perturbations est caractérisé par l'étude de paramètres biologiques (viabilité, croissance, métabolisme) mais aussi de modifications structurales et morphologiques. Un intérêt particulier est porté à la membrane plasmique des micro-organismes car cette structure est à l'interface des environnements intra- et extracellulaires et subit des contraintes fortes lors de l'application de perturbations de l'environnement des cellules. L'étude des altérations de cette structure s'appuie sur l'utilisation d'outils du Plateau d'Imagerie Spectroscopique (PIMS), hébergé au sein de l'équipe PMB, tels que la microscopie confocale et la spectroscopie résolue en temps de vie.

Une grande partie des travaux de recherche que j'ai menés jusqu'à maintenant ont ciblé des micro-organismes d'intérêt comprenant des ferments et des probiotiques. Pour ces micro-organismes, je me suis intéressé aux perturbations cellulaires induites par des modifications physico-chimiques du milieu et par la déshydratation dans le but de développer et d'optimiser des procédés de production et de stabilisation de micro-organismes d'intérêt. Plus récemment, depuis environ 6 ans, je travaille également sur des micro-organismes d'altération des aliments pour lesquels mes travaux de recherche ont focalisé sur l'effet de la lumière visible à très haute intensité dont la finalité applicative sera le développement d'un procédé d'inactivation microbienne.

Dans la partie suivante de ce manuscrit, la synthèse des travaux de recherche sera présentée en trois parties. La première concernera la compréhension des mécanismes de résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à la déshydratation. La seconde focalisera sur la production et la stabilisation de bactéries probiotiques. Enfin, une dernière partie présentera les effets de la lumière visible à haute intensité sur des micro-organismes. Les travaux présentés dans ces trois parties étaient articulés autour de questions scientifiques fondamentales dont les principales sont :

**Quelles sont les bases moléculaires et structurales permettant à des micro-organismes de résister à des cycles de déshydratation/réhydratation ?**

**Quelles sont les bases moléculaires et structurales permettant la survie à l'état déshydraté (anhydrobiose) de micro-organismes ?**

**Quels sont les effets moléculaires et structuraux de l'application de traitement lumineux visibles à ultra-haute intensité sur des micro-organismes ?**



### 3.3. Synthèse des travaux de recherche

#### 3.3.1. Compréhension de l'anhydrobiose par l'étude de *Saccharomyces cerevisiae*

L'eau est un composant essentiel des cellules biologiques représentant plus de 70% de la masse d'une cellule. Cette molécule possède des propriétés uniques la rendant essentielle pour les réactions biochimiques, pour la structure des macromolécules et pour la mobilité moléculaire (Ball 2008). Cependant, certains organismes sont capables de survivre et persister sur des durées longues lors d'une diminution drastique de leur contenu en eau. Le métabolisme de ces organismes, appelés anhydrobiotes, est fortement ralenti à l'état déshydraté pour être réactivé lors du retour dans des conditions hydriques physiologiques (Crowe et al. 1992). Parmi ces organismes, la levure *S. cerevisiae* est un très bon modèle pour étudier ce phénomène et son aptitude au séchage est largement utilisée industriellement pour produire des formes sèches de ferments et des probiotiques (Gélinas 2019). Pour les organismes non anhydrobiotiques, la mort peut intervenir pendant les phases transitoires de déshydratation ou de réhydratation mais aussi pendant le maintien à l'état déshydraté si le système n'est pas correctement stabilisé. La survie au séchage et pendant un maintien à l'état sec des levures est principalement reliée à sa capacité à produire du tréhalose (Wiemken 1990). Cependant, les mécanismes physico-chimiques associés à ce sucre ne sont pas totalement élucidés. Également, bien que cette levure soit considérée comme un anhydrobiote, sa survie au séchage n'est pas systématique et dépend de paramètres du procédé utilisé, notamment de la vitesse de déshydratation (Simonin et al. 2007).

Les travaux présentés dans ces parties se sont attachés à **approfondir les mécanismes cellulaires permettant à la levure *S. cerevisiae* de résister à des perturbations hydriques et à maintenir sa viabilité à faible hydratation**. Ces travaux sont principalement issus de ma thèse réalisée entre 2007 et 2011 au laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires (Université de Bourgogne, Dijon) et de la **thèse de Pauline Ribert (2018-2021)** que j'ai co-dirigée (co-direction 50% avec Laurent Beney).

##### *3.3.1.1. Impact de la cinétique sur la survie de *S. cerevisiae* lors de perturbations hydriques*

L'impact de la vitesse de déshydratation et de réhydratation de micro-organismes sur leur viabilité est un sujet de recherche qui est travaillé depuis de nombreuses années au sein de l'équipe PMB de l'UMR PAM. Les premiers travaux réalisés au début des années 90 ont montré qu'une déshydratation osmotique progressive permet d'obtenir des taux de survie plus élevés chez les levures *S. cerevisiae* et *Sporidiobolus salmonicolor* en comparaison avec une déshydratation brutale (Gervais et al. 1992). Cet impact s'observe également sur des bactéries (Poirier et al. 1997). Dans la suite de ces travaux, il a été montré que la réhydratation est également une étape critique dans le maintien de la survie des micro-organismes lors des cycles de déshydratation-réhydratation. Notamment, l'amplitude de réhydratation (Mille et al. 2000; Simonin et al. 2007) ainsi que la cinétique de cette étape (Mille et al. 2003) ont une influence forte sur les taux de

survie à ces cycles. Ces études ont montré que la membrane plasmique des micro-organismes est une cible majeure de ces traitements et que sa perte d'intégrité est à l'origine des faibles taux de survie lors de perturbations hydriques rapides. Les mécanismes cellulaires à l'origine de la survie des micro-organismes lors de perturbations progressives n'étaient cependant pas compris.

La première partie de mes travaux de thèse avait pour principal objectif de comprendre l'effet des cinétiques de déshydratation et de réhydratation sur la membrane plasmique des levures pour tenter d'expliquer l'effet de ce paramètre sur la survie. Afin de cibler des conditions d'étude permettant d'étudier cet effet, la viabilité de levures *S. cerevisiae* a tout d'abord été estimée après des traitements hyperosmotiques réalisés avec du glycérol. Ce soluté permet d'atteindre des niveaux de pression osmotique élevés. L'amplitude de déshydratation ainsi que les cinétiques de déshydratation et de réhydratation ont été contrôlées (Tableau 2).

Tableau 2. Impact de l'amplitude et des cinétiques de déshydratation et de réhydratation sur la survie de la levure. Les levures sont maintenues 60 min en conditions hyperosmotiques (30, 110 ou 166 MPa) avant réhydratation (Dupont et al. 2010).

Amplitudes	Profils de cinétiques			
	A	B	C	D
<b>30 MPa</b>	86,0% (3,6)	86,2% (3,9)	88,2% (8,4)	83,5% (2,5)
<b>110 MPa</b>	86,9% (11,6)	67,7% (4,7)	41,7% (12,7)	12,5% (9,1)
<b>166 MPa</b>	78,7% (3,6)	42,6% (3,6)	19,2% (1,1)	0,3% (0,2)

$\pi$  correspond à la pression osmotique du milieu extracellulaire. (A) Déshydratation progressive et réhydratation progressive, (B) déshydratation progressive et réhydratation brutale, (C) déshydratation brutale et réhydratation progressive, (D) déshydratation brutale et réhydratation brutale. Les taux de survie ont été mesurés par la méthode UFC après réhydratation à 1,4 MPa. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois manipulations indépendantes.

Pour les traitements de faible amplitude (30 MPa), la survie des levures est faiblement affectée avec un taux de survie d'environ 85% quelles que soient les cinétiques de déshydratation et de réhydratation. Pour les traitements de plus fortes amplitudes (110 et 166 MPa), la survie est la plus forte lorsque la déshydratation et la réhydratation sont réalisées progressivement. Par exemple, le taux de survie est de 78,7% pour un cycle à 166 MPa réalisé progressivement alors qu'il est de 0,3% lorsque la déshydratation et la réhydratation sont réalisées brutalement. Sur la base de ces résultats, les traitements à 166 MPa ont été choisis pour étudier l'effet des cinétiques de perturbation sur la membrane plasmique.

Afin de mieux comprendre l'évolution de la fonctionnalité de la membrane plasmique lors d'un cycle de déshydratation/réhydratation, les levures ont été marquées par de l'iodure de propidium à différents moments dans le cycle (Figure 10A). L'iodure de propidium est une sonde fluorescente qui pénètre dans les cellules lorsque la membrane plasmique perd son intégrité et fluoresce lors de sa fixation aux acides nucléiques.

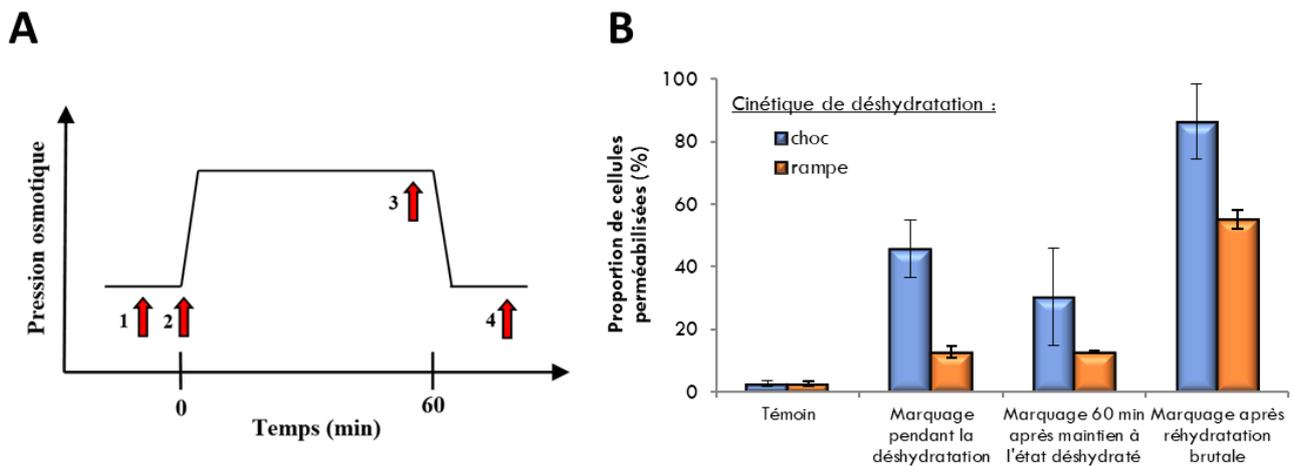


Figure 10. Estimation de l'intégrité de la levure pendant un cycle déshydratation-réhydratation. (A) Protocole de coloration des cellules avec l'iodure de propidium (IP) afin d'étudier l'évolution de la perméabilité membranaire au cours des traitements. Les flèches représentent le moment de la coloration des cellules : 0 min correspond au début du traitement hyperosmotique. L'IP a été introduit (1) avant, (2) pendant, (3) 60 min après le traitement de déshydratation, et (4) après l'étape de réhydratation. Une déshydratation rapide (choc) et une déshydratation progressive (pente) ont été réalisées. (B) Proportion de cellules perméabilisées (colorées positivement avec PI) pendant et 60 min après un traitement de déshydratation à 166 MPa, et après une réhydratation rapide à 1,4 MPa. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type calculé à partir de trois expériences répétées (Dupont et al. 2010).

Lors d'une déshydratation brutale à 166 MPa, 46% de la population de levures sont perméabilisés par la phase de déshydratation (Figure 10B). Cette proportion n'évolue pas significativement pendant l'heure de maintien dans les conditions hyperosmotiques révélant une perméabilisation qui n'est pas transitoire et qui n'évolue pas dans le temps. Cette proportion évolue cependant lors de la phase de réhydratation. Après réhydratation brutale, la proportion atteint 87%. Dans le cas d'une déshydratation progressive, la proportion de cellules perméabilisées est de 13% après la déshydratation. Ceci indique que la vitesse de déshydratation influe directement sur la perte d'intégrité de la membrane. La réhydratation brutale de cellules déshydratées progressivement a conduit à un taux de perméabilisation de 55%. Ces résultats confirment que la réhydratation est également une étape critique pour la survie des cellules, quelle que soit la cinétique de déshydratation. Le cas le plus favorable correspondant à une déshydratation et une réhydratation progressives n'est pas représenté sur la figure mais conduit à un taux de perméabilisation de 16%. L'ensemble de ces résultats montre que les altérations de la membrane plasmique se produisent lors de la déshydratation et de la réhydratation. Ces altérations dépendent cependant des cinétiques de perturbation.

Afin de comprendre l'effet de la cinétique, la membrane plasmique des levures a été étudiée après des déshydratations progressives (rampes osmotiques) et de brutales (chocs osmotiques). Pour cela, des observations de la membrane ont été réalisées en microscopie confocale et en microscopie électronique à transmission (Figure 11).

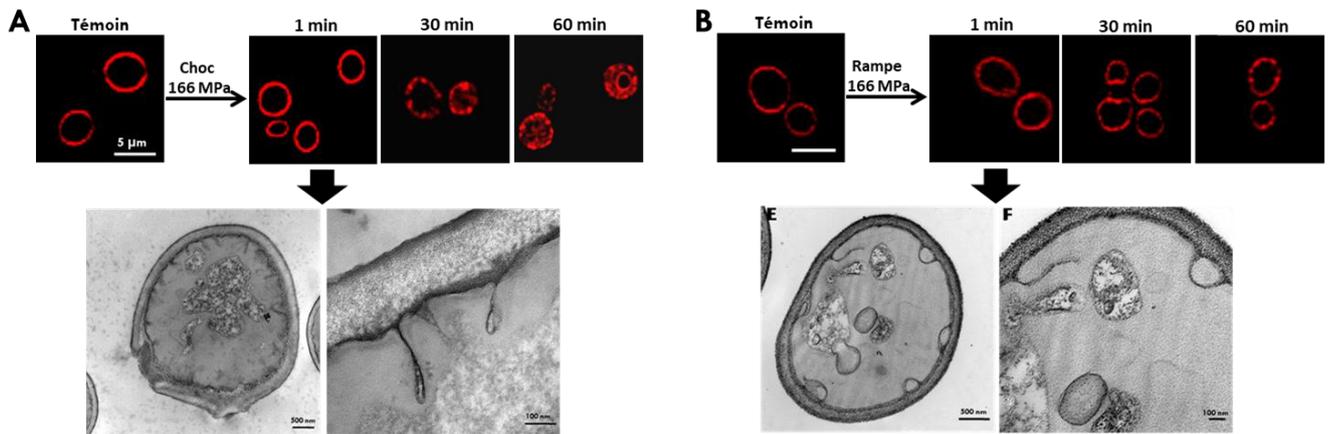


Figure 11. Observations de l'effet de perturbations hyperosmotiques sur la membrane plasmique de levures *S. cerevisiae*. Les observations ont été réalisées en microscopie confocale après marquage par le FM 4-64 (images du haut) et par microscopie électronique à transmission (images du bas). (A) Evolution de la membrane plasmique après un choc à 166 MPa. (B) Evolution de la membrane plasmique après une rampe à 166 MPa (Dupont et al. 2010).

L'observation de l'évolution du marquage membranaire au FM 4-64 par microscopie confocale révèle une internalisation de membrane plasmique au cours du temps après un choc osmotique à 166 MPa (Figure 11A). Cette internalisation ne se produit pas si les levures sont déshydratées progressivement (Figure 11B). Cette différence peut s'expliquer par les types de déformation que subit la membrane plasmique lors de la déshydratation. Lors de la déshydratation, la sortie d'eau des cellules conduit à une diminution du volume cellulaire qui atteint environ 50% du volume initial quelle que soit la cinétique de déshydratation. La membrane plasmique des cellules biologiques n'étant que faiblement compressible (Evans et al. 1976), la membrane se déforme pour dissiper l'excès de surface. Dans le cas des déshydratations brutales, les déformations se manifestent sous forme de nombreuses petites invaginations qui forment ensuite des vésicules conduisant à l'internalisation de membrane plasmique (Figure 11A). Dans le cas de déshydratations progressives, la dissipation est réalisée sous forme de quelques gros replis membranaires stables dans le temps (Figure 11B).

Le mécanisme à l'origine de l'effet de la cinétique de déshydratation sur le type de déformation membranaire a ensuite été recherché. Pour cela, nous avons étudié l'évolution de l'organisation latérale de la membrane par l'observation de la distribution de la protéine Sur7 fusionnée à une protéine fluorescente (GFP). La protéine Sur7 est décrite pour être positionnée exclusivement dans des microdomaines membranaires enrichis en ergostérol (Grossmann et al. 2007). Dans les conditions physiologiques, la protéine Sur7 n'est pas répartie de manière homogène sur l'ensemble de la membrane plasmique mais est distribuée au sein de microdomaines (Figure 12A). L'analyse de profils d'intensité de fluorescence réalisés sur des coupes médianes de levures a permis d'estimer un nombre moyen de 11 microdomaines par coupe de levure avec une taille moyenne d'environ 500 nm (Figure 12B).

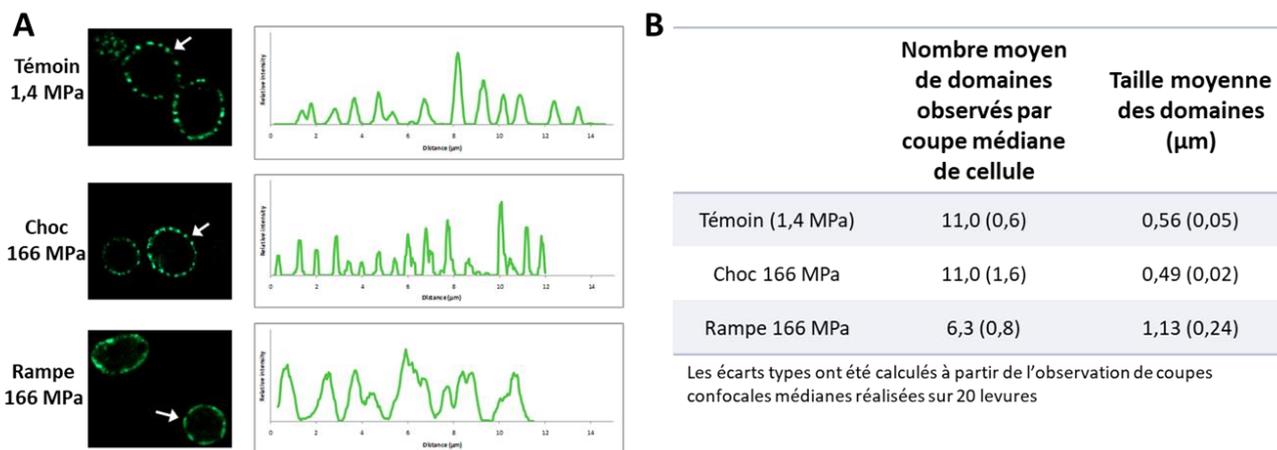


Figure 12. Impact de la cinétique de déshydratation à 166 MPa sur la répartition et la taille des domaines membranaires Sur7-GFP de la levure *S. cerevisiae*. (A) Observations en microscopie confocale de levures témoins, levures après déshydratation en choc à 166 MPa, et levures après déshydratation progressive à 166 MPa. Sur la gauche, coupes optiques médianes de levures. Sur la droite, profils représentatifs d'intensité de fluorescence mesurés sur une coupe confocale médiane de levure. Chaque profil correspond à la levure indiquée par la flèche blanche. Un seuillage moyen a été appliqué sur les courbes obtenues pour réduire le bruit présent dans les données brutes et les courbes ont été normalisées à la même valeur maximale. (B) Tableau synthétisant l'impact de la cinétique de déshydratation sur le nombre et la taille des microdomaines contenant la protéine Sur7-GFP (Dupont et al. 2010).

Après un choc hyperosmotique à 166 MPa, la distribution en patches de la protéine Sur7 peut toujours être observée (Figure 12A). Le nombre de microdomaines ne change pas mais ils sont cependant légèrement plus petits (Figure 12B). Après une rampe hyperosmotique jusqu'à 166 MPa, la répartition de cette protéine est modifiée : la protéine se localise dans des domaines membranaires plus grands et moins nombreux (Figure 12A). En effet, l'analyse des profils d'intensité de fluorescence révèle que le nombre moyen de domaine est réduit à environ 6 avec une taille moyenne de 1,1 µm (Figure 12B). Cela suggère que la déshydratation progressive conduit à une réorganisation latérale de la protéine Sur7 et, plus généralement, à une réorganisation des composants membranaires qui n'intervient pas lors d'une déshydratation brutale.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude permet de proposer des mécanismes cellulaires pouvant expliquer l'effet des cinétiques de déshydratation et de réhydratation sur la survie des levures à des perturbations hydriques (Figure 13). Ces mécanismes peuvent être résumés :

- Les perturbations hyperosmotiques progressives permettent une réorganisation latérale des composants membranaires pendant la déshydratation. Cela conduit à la formation de gros replis membranaires sans perte d'intégrité de la membrane lors de la phase de diminution du volume cellulaire. Lors de la réhydratation, la surface membranaire est suffisante pour que la cellule retrouve son volume initial sans perméabilisation. Ces mécanismes expliquent les forts taux de survie pour ces cinétiques.
- Les perturbations hyperosmotiques brutales ne permettent pas aux composants membranaires de se redistribuer. Cela conduit à une perte d'intégrité de la membrane pour une partie de la population de levures et à des déformations membranaires

conduisant à une internalisation de membrane plasmique. Cette internalisation est à l'origine d'une diminution de la surface membranaire qui devient alors insuffisante lors de la réhydratation pour permettre à la levure de retrouver son volume physiologique sans être perméabilisée. Ces mécanismes expliquent les faibles taux de survie pour les cinétiques brutales.

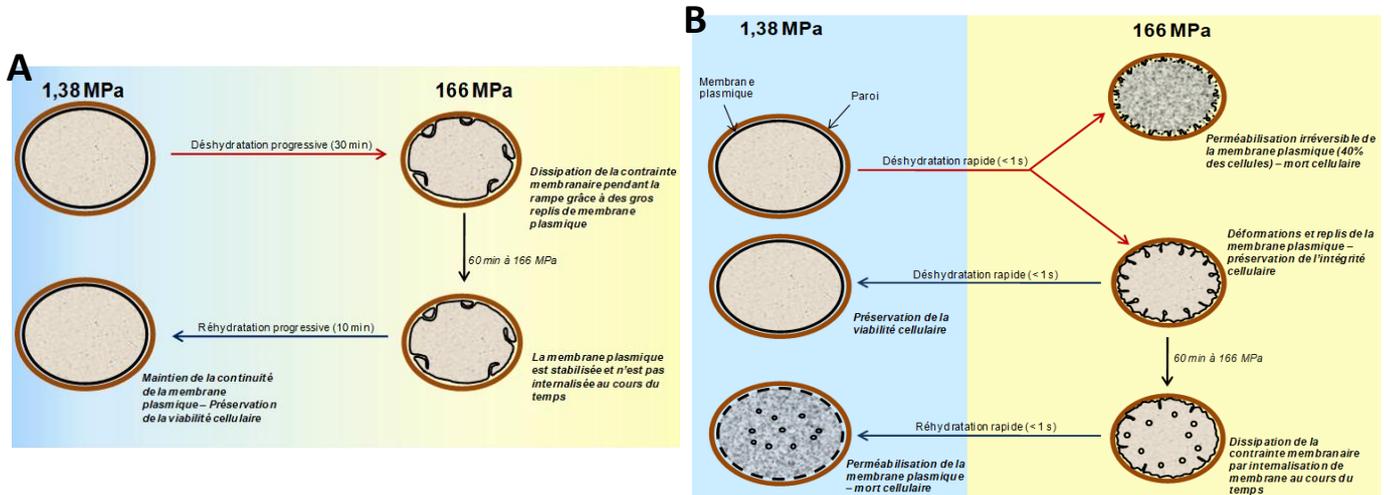


Figure 13. Schéma de l'impact des cinétiques de déshydratation et de réhydratation sur la membrane plasmique de levures. (A) Scénario membranaire lors de perturbations hydriques progressives permettant le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. (B) Scénario membranaire lors de perturbations hydriques brutales conduisant à la perte d'intégrité de la membrane plasmique.

**Bien qu'observé et décrit pour de nombreuses perturbations (thermique, hydrique, hautes pressions...), l'effet des cinétiques de perturbation sur la viabilité de micro-organismes n'était que très peu compris et les mécanismes cellulaires supportant cet effet restaient à élucider. D'un point de vue fondamental, cette étude a permis de proposer des mécanismes cellulaires permettant d'expliquer cet effet pour les perturbations hydriques. D'un point de vue appliqué, ces résultats permettent d'envisager des optimisations dans les procédés de stabilisation de micro-organismes qui impliquent des perturbations hydriques (séchage ou congélation).**

**Publications liées au thème des travaux présentés dans cette partie :**

- 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. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, 1798(5), 975-985.
- Lemetais, G., Dupont, S., Beney, L., & Gervais, P. (2012). Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 96(2), 471-480.

### 3.3.1.2. Rôle clé de l'ergostérol dans la résistance des levures aux perturbations hydriques

Les travaux présentés dans la partie précédente ont montré que les perturbations hydriques sont à l'origine de contraintes mécaniques fortes au niveau de la membrane plasmique des micro-organismes lors des variations du volume cellulaire. Les perturbations progressives sont associées à une réorganisation latérale des composants membranaires permettant à la levure *S. cerevisiae* de résister à ces contraintes. Cependant, beaucoup de micro-organismes, incluant des levures et des bactéries, ne sont pas des anhydrobiotes et sont sensibles aux perturbations hydriques même lorsque celles-ci sont réalisées progressivement. La composition lipidique de la membrane plasmique, notamment la nature des lipides, est un paramètre influant la tolérance et la résistance de micro-organismes à des perturbations environnementales telles que la congélation, la présence d'éthanol ou bien encore le froid (Rodríguez-Vargas et al. 2007; de Sarrau et al. 2013). Ce lien entre nature des lipides et résistance repose sur l'effet de la composition de la membrane sur ses propriétés physiques. Les stérols sont les lipides majoritaires des membranes eucaryotes et l'une de leur fonction est de stabiliser la membrane plasmique lors de perturbations environnementales. Chez la levure *S. cerevisiae*, le stérol principalement accumulé est l'ergostérol avec un ratio molaire ergostérol/phospholipides d'environ 0,4 (Bottema et al. 1983; Schneiter et al. 1999). Nous avons donc cherché à étudier si l'ergostérol jouait un rôle dans la résistance de cette levure aux perturbations hydriques.

La stratégie utilisée a reposé sur l'utilisation de souches de levure mutantes délétées pour des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Comme tous les stérols des organismes eucaryotes, l'ergostérol provient de la transformation de l'acétyl CoA (Figure 14A). Chacune de ces souches accumulent des stérols dont la structure diffère de celle de l'ergostérol. Cette structure est d'autant plus différente de l'ergostérol que la délétion est effectuée tôt dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Figure 14B).

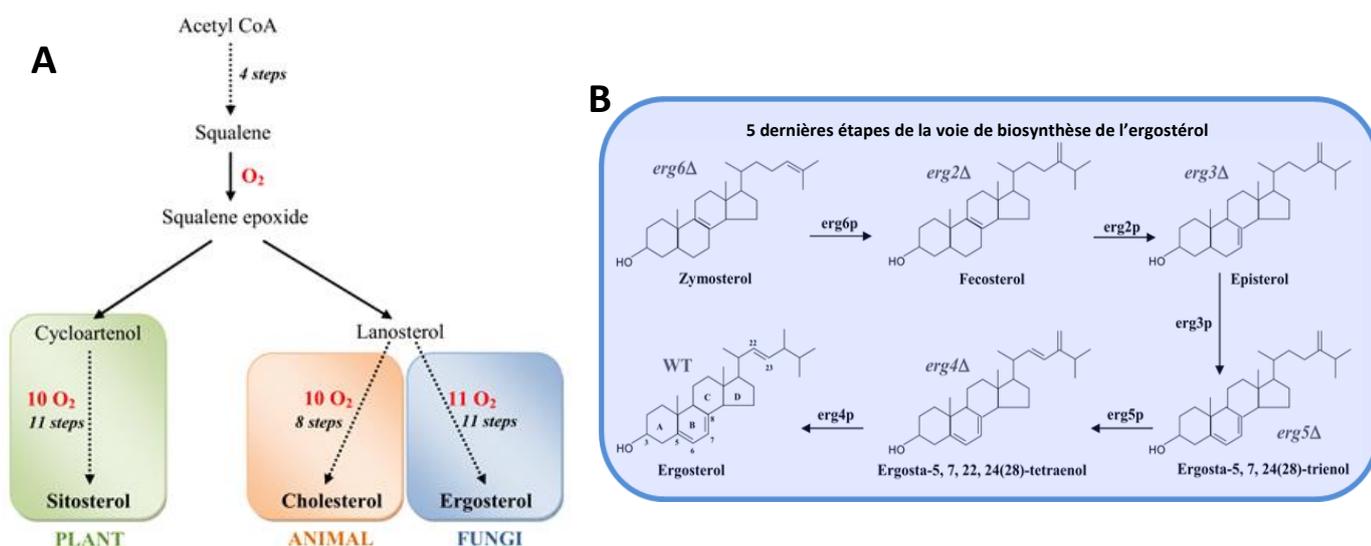


Figure 14. Voie de biosynthèse de l'ergostérol. (A) Voies de biosynthèse des stérols dans les différents règnes eucaryotes. (B) Dernières étapes spécifiques à la biosynthèse de l'ergostérol chez les champignons (Dupont et al. 2012).

Les différentes souches mutantes et la souche sauvage (Wild Type) ont été soumises à un séchage (Humidité Relative de 72%) puis réhydratées. Le séchage a été réalisé sous air ambiant ou sous azote pour évaluer l'effet de la présence d'oxygène lors du séchage. La viabilité des souches a ensuite été mesurée pour estimer la survie à ce cycle de déshydratation/réhydratation (Figure 15)

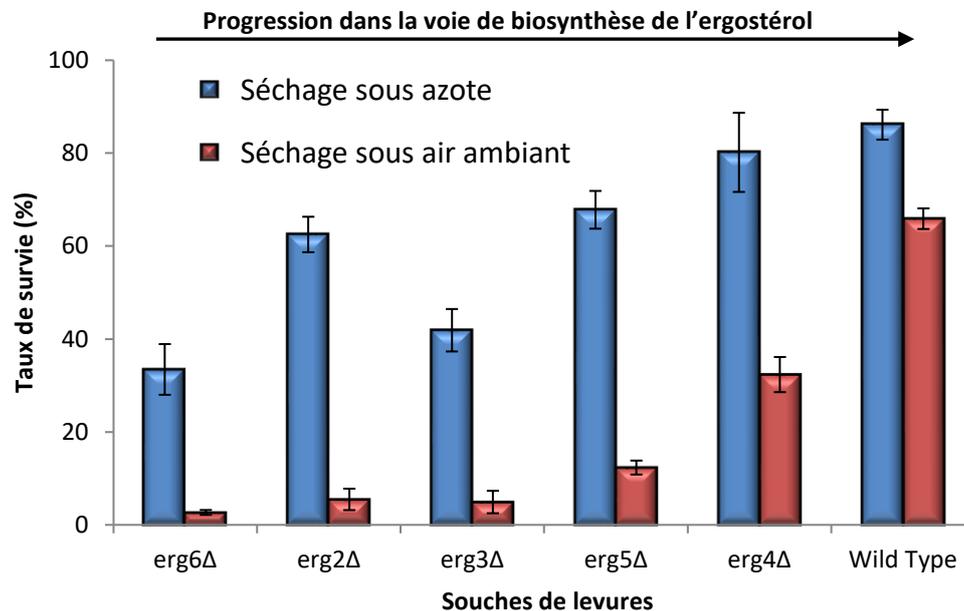


Figure 15. Survie des différentes souches de levures séchées à une humidité relative de 72% en présence ou en absence d'oxygène. Les mesures de viabilité ont été réalisées par UFC après maintien des levures dans l'état déshydraté pendant 60 min suivi d'une réhydratation rapide jusqu'à 1,4 MPa. Les écarts types sont issus de trois manipulations indépendantes (Dupont et al. 2012).

Le séchage réalisé sous azote en absence d'oxygène a conduit à des taux de survie après réhydratation supérieurs par rapport au séchage réalisé sous air atmosphérique quelle que soit la souche de levure. Ces résultats suggèrent que l'oxygène présent dans l'air atmosphérique influe sur la viabilité des différentes souches de levures lors d'une déshydratation par séchage. Ces résultats permettent de proposer l'hypothèse qu'une oxydation de la membrane plasmique se produit lors d'un séchage en présence d'oxygène. L'explication de la résistance variable des différentes souches serait que la structure des stérols membranaires pourrait influencer l'oxydation de la membrane plasmique. L'oxydation n'est cependant pas le seul phénomène létal puisque les mutants sont également plus sensibles que la souche sauvage lorsque le séchage est réalisé sous azote. L'ergostérol pourrait donc également être impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire lors des contraintes mécaniques imposées par les variations de volume liées à la déshydratation et la réhydratation.

Ces différentes hypothèses concernant l'implication de l'ergostérol dans la survie au séchage ont été éprouvées par la réalisation de deux études permettant de séparer les perturbations oxydatives et mécaniques que subissent les levures lors d'une déshydratation par séchage.

L'étude de l'effet des contraintes mécaniques associées à la déshydratation a été réalisée par l'application de perturbations osmotiques pour lesquelles les phénomènes oxydatifs peuvent être considérés comme mineurs. Ces expérimentations ont été réalisées sur la souche mutante  $\Delta erg6$ , la plus sensible au séchage, et la souche sauvage. La survie après une perturbation hyperosmotique à 30 MPa réalisée avec du glycérol a été mesurée (Figure 16A). L'intégrité de la membrane plasmique a été estimée après la perturbation hyperosmotique et après réhydratation (retour à des conditions osmotiques physiologiques) (Figure 16B).

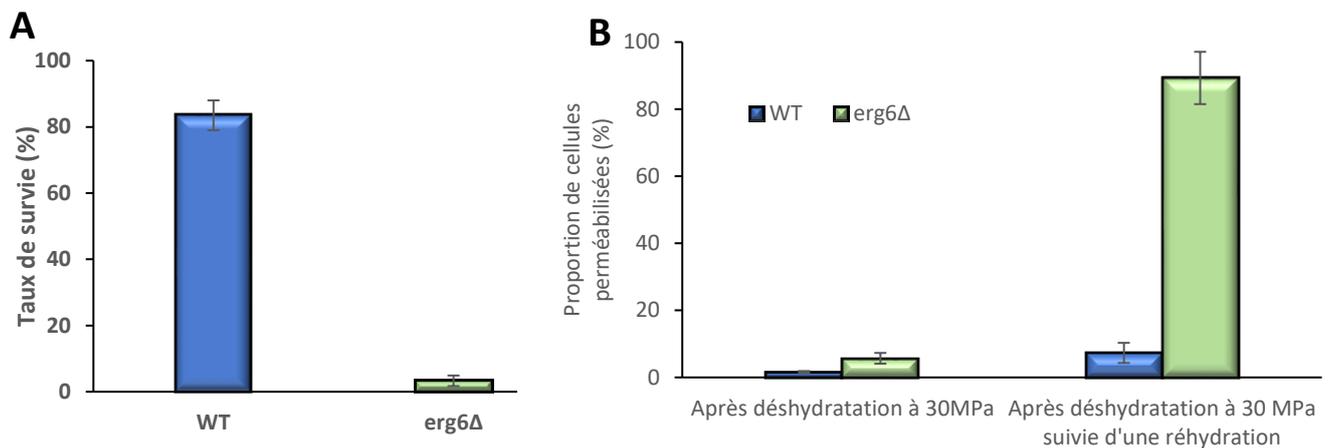


Figure 16. Effets d'une perturbation hyperosmotique à 30 MPa (glycérol) sur les souches de levure sauvage et  $\Delta erg6$ . (A) Taux de survie estimés par la méthode des UFC. (B) Pourcentage de levures perméabilisées au cours du cycle de déshydratation / réhydratation estimé par cytométrie en flux et marquage à l'iodure de propidium. Les écarts types sont issus de trois manipulations indépendantes (Dupont et al. 2011).

Les résultats obtenus ont révélé une sensibilité plus forte de la souche mutante (3% de survie) en comparaison de la souche sauvage (84% de survie). Cette sensibilité est à rapprocher de la perte d'intégrité de la membrane plasmique d'environ 90% de la population de la souche mutante contre 7% pour la souche sauvage après le cycle complet déshydratation/réhydratation. La perte d'intégrité de la souche mutante se produit principalement pendant la phase de réhydratation. Pour comprendre ce phénomène, l'ultrastructure des levures a été observée par microscopie électronique à transmission après la déshydratation à 30 MPa (Figure 17).

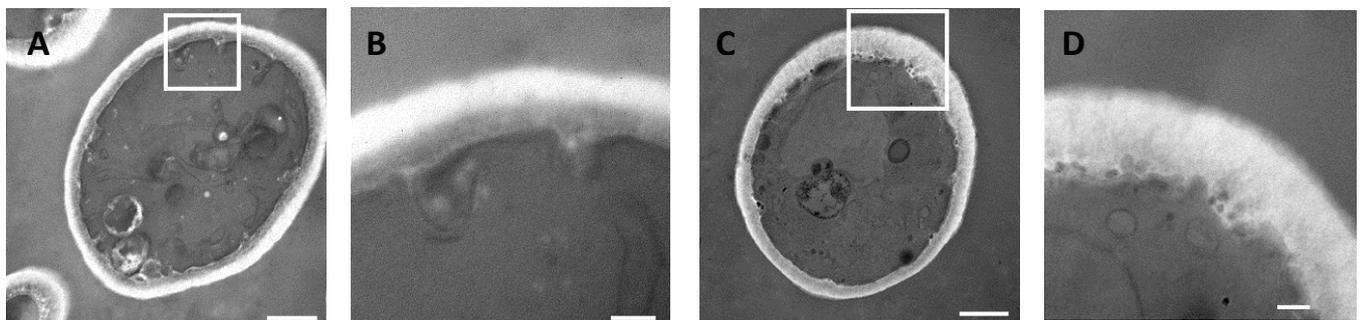


Figure 17. Observation en microscopie électronique à transmission des levures sauvage et  $\Delta erg6$  après un choc hyperosmotique à 30 MPa. Les photographies (A) et (B) correspondent aux levures de souche sauvage, et (C) et (D) aux levures mutantes  $\Delta erg6$  après un choc à 30 MPa. Les barres d'échelle sont égales à 500 nm pour (A) et (C), et à 100 nm pour (B) et (D) (Dupont et al. 2011).

Sous l'effet de la diminution de volume associée à la déshydratation, les observations réalisées ont montré que la membrane plasmique de la souche sauvage se déforme en de profondes invaginations alors que de nombreuses vésicules se forment entre membrane et paroi dans le cas de la souche mutante. La formation de vésicules diminue la surface membranaire ce qui peut expliquer la perméabilisation lors de la réhydratation puisque la surface est devenue insuffisante pour permettre à la levure de retourner au volume physiologique initial. L'ensemble de ces résultats montrent que l'ergostérol joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité membranaire et la survie des levures lors des contraintes mécaniques subies par la membrane lors de perturbations hydriques.

Le possible rôle de l'ergostérol dans la résistance des levures à l'oxydation a également été étudié. La démarche appliquée a consisté à étudier ce rôle au travers d'expérimentation *in vivo* (résistance de levures sauvage et mutantes à une oxydation lipidique), *in vitro* (cinétique d'oxydation de liposomes avec des compositions en stérols différentes) et *in silico* (analyse computationnelle de la réactivité des stérols) (Figure 18).

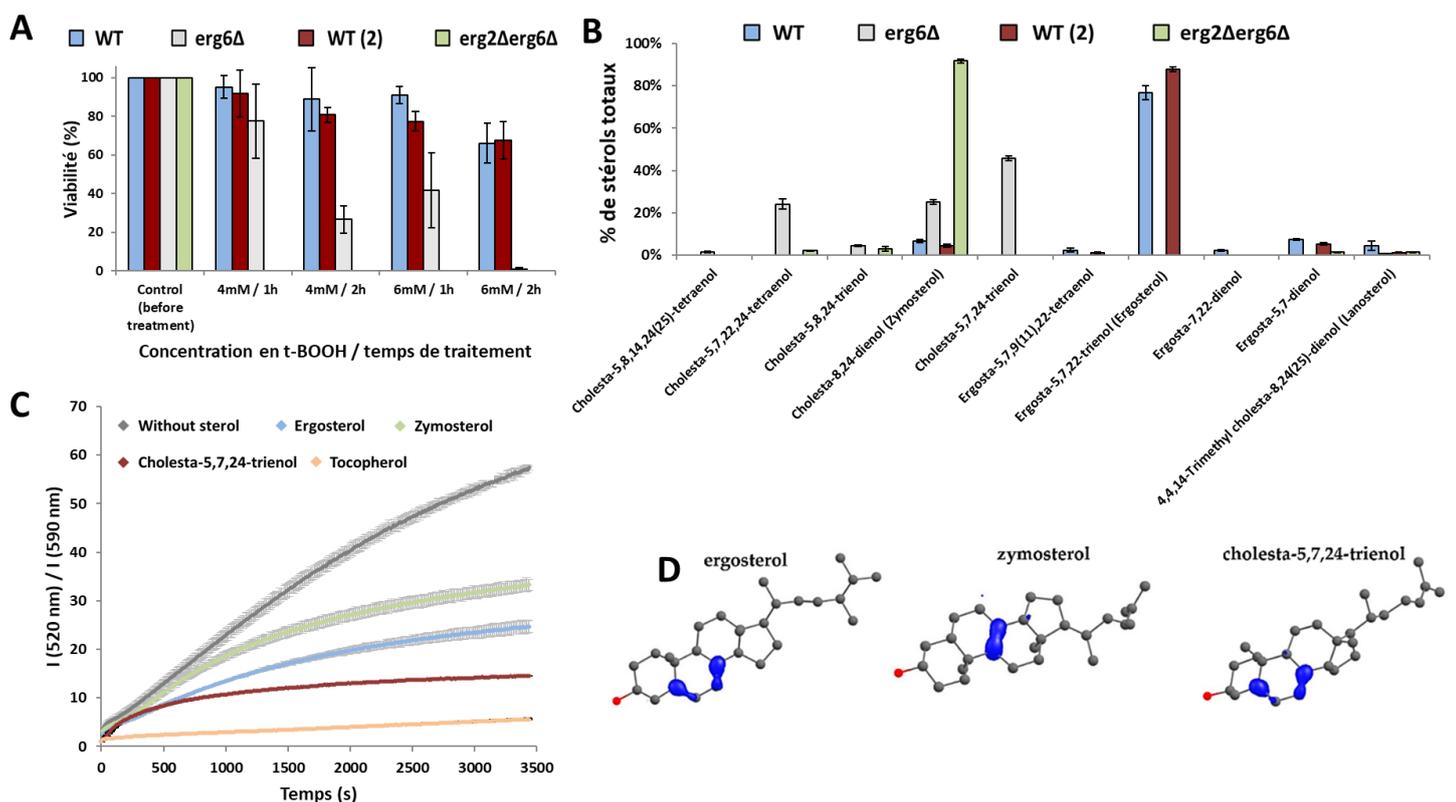


Figure 18. Rôle de l'ergostérol dans la résistance des levures à l'oxydation. (A) Survie de levures de souche sauvage (WT et WT(2) et mutantes  $\Delta erg6$  et  $\Delta erg6\Delta erg2$  à un traitement oxydatif au t-BOOH. (B) Composition en stérols des différentes souches de levure analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. (C) Cinétique d'oxydation de liposomes fabriqués partir de phospholipides naturels de levures avec différentes compositions en stérols. L'oxydation a été générée par de l'hydroperoxyde de cumène (2 mM) et mesurée par l'utilisation de la sonde C11-BODIPY 581/591 pour laquelle l'augmentation du ratio  $I(520\text{ nm}) / I(590\text{ nm})$  correspond à l'oxydation des phospholipides. (D) Représentation de la densité de spin des cations radicalaires de l'ergostérol, du zymostérol et du cholesta-5,7,24-trienol (Dupont et al. 2021).

Par l'approche *in vivo*, il a pu être observé que les souche de levures délétées pour des gènes de voie de biosynthèse de l'ergostérol ( $\Delta erg6$  et  $\Delta erg6\Delta erg2$ ) sont plus sensibles à un traitement oxydatif au tert-butylhydroperoxyde (t-BOOH) que leur souche sauvage respective (WT et WT(2)) (Figure 18A). La sensibilité la plus forte est observée pour la souche  $\Delta erg6\Delta erg2$  pour laquelle aucune survie n'est observée même pour le traitement le moins drastique testé (4 mM de t-BOOH pendant 1 h). L'analyse de la composition en stérols des différentes souches a montré que les souches de type sauvage accumulent principalement l'ergostérol (> 80%) alors que la souche  $\Delta erg6$  accumule principalement le cholesta-5,7,24-trienol (45%), le zymostérol (25%) et le cholesta-5,7,14,24-tetraenol (24%) et la souche  $\Delta erg6\Delta erg2$  le zymostérol (92%) (Figure 18B). Afin de s'assurer que les sensibilités différentes des souches étaient bien reliées aux différences de composition en stérols et à un rôle anti-oxydant des stérols, des liposomes ont été préparés à base d'extraits polaires de lipides de levures *S. cerevisiae*. Différents stérols ont été incorporés dans ces liposomes puis la cinétique d'oxydation des phospholipides par l'hydroperoxyde de cumène a été suivie (Figure 18C). La présence de stérols, en comparaison avec des liposomes ne contenant pas de stérol, limite l'oxydation de la bicouche lipidique. L'effet anti-oxydant dépend cependant de la nature des stérols. Il est le plus important pour le cholesta-5,7,24-trienol, puis pour l'ergostérol et enfin le zymostérol. Pour comprendre cet effet, une analyse computationnelle de la réactivité de ces 3 molécules a été réalisée. Cette analyse a permis de montrer que l'ergostérol et le cholesta-5,7,24-trienol présentent une capacité antioxydante liée à deux doubles liaisons conjuguées dans le cycle B de leur structure leur permettant de s'oxyder facilement tout en conservant cependant une relative stabilité par un phénomène de résonance des électrons (Figure 18D). L'ensemble de ces résultats permettent de conclure à une activité anti-oxydante de l'ergostérol jouant un rôle dans la protection des levures face à l'oxydation.

**Les travaux présentés dans cette partie ont permis de démontrer le rôle clé de l'ergostérol dans la résistance des levures au séchage. Les mécanismes cellulaires associés à ce rôle ont pu être mis en évidence. D'un point de vue fondamental, ces travaux permettent de proposer une fonction supplémentaire d'anti-oxydant de certains stérols en plus de la fonction structurante des stérols déjà largement étudiée et décrite. Le rôle de l'ergostérol dans la résistance aux perturbations hydriques pourrait expliquer pourquoi ce stérol a été retenu par l'évolution chez les champignons supérieurs puisque ces organismes sont assujettis à des fluctuations hydriques fréquentes dans leur milieu naturel. D'un point de vue appliqué, cette connaissance peut être utile pour prédire l'aptitude au séchage de différentes levures sur la base de leur composition en stérol. La supplémentation en ergostérol pourrait également être un levier pour améliorer la survie au séchage de souches sensibles.**

**Publications en lien avec les travaux présentés dans cette partie :**

- **Dupont, S.**, Beney, L., Ferreira, T., & Gervais, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, 1808(6), 1520-1528.
- **Dupont, S.**, Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis : A fungal pathway for life on land? *EVOLUTION*, 66(9), 2961-2968.
- **Dupont, S.**, Rapoport, A., Gervais, P., & Beney, L. (2014). Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 98(21), 8821-8834.
- **Dupont, S.**, Fleurat-Lessard, P., Cruz, R. G., Lafarge, C., Grangeteau, C., Yahou, F., Gerbeau-Pissot, P., Abrahão Júnior, O., Gervais, P., Simon-Plas, F., Cayot, P., & Beney, L. (2021). Antioxidant Properties of Ergosterol and Its Role in Yeast Resistance to Oxidation. *ANTIOXIDANTS*, 10(7), 1024.

### 3.3.1.3. Rôle du tréhalose dans la persistance des levures à l'état déshydraté

Les travaux présentés dans les deux parties précédentes ont montré que les phases transitoires des perturbations hydriques, correspondant à la déshydratation et la réhydratation, sont critiques pour la viabilité des micro-organismes. Cependant, la mortalité induite par des perturbations hydriques peut également se manifester lors du maintien à l'état sec des micro-organismes, notamment si le niveau de déshydratation n'est pas suffisant (Mugnier and Jung 1985). En effet, la déshydratation doit être suffisante pour limiter/stopper les réactions de dégradation cellulaires. De nombreux travaux sur les organismes anhydrobiotes ont mis en avant le tréhalose comme une molécule essentielle associée à la persistance des organismes à l'état sec (Leslie et al. 1994; Tunnacliffe and Lapinski 2003). Le rôle du tréhalose repose sur sa capacité à stabiliser les macromolécules et les membranes lors d'une déshydratation.

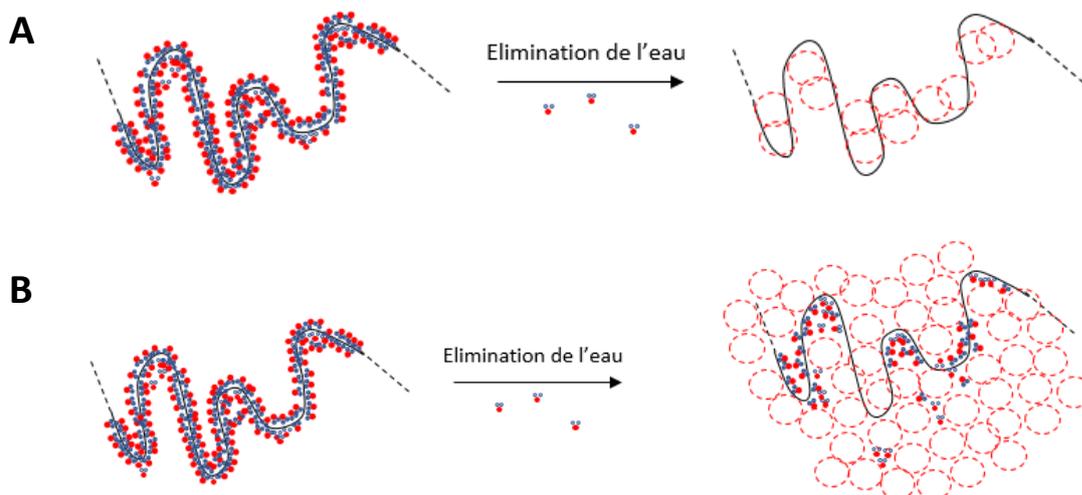


Figure 19. Schéma des mécanismes de stabilisation des macromolécules par le tréhalose. ● représente les molécules d'eau et ○ représente les molécules de tréhalose. (A) Mécanisme du remplacement des molécules d'eau. (B) Mécanisme de l'exclusion préférentielle. (Ribert 2021)

Trois principaux mécanismes sont proposés pour expliquer le rôle stabilisant du tréhalose. Le premier repose sur la capacité du tréhalose à former un verre lors de sa concentration associée à la déshydratation. Les verres formés avec le tréhalose sont des structures amorphes dans lesquels

la viscosité est très forte ( $> 10^{12}$  Pa.s) et donc la mobilité moléculaire est très réduite. Le second mécanisme est le remplacement de l'eau dans lequel les molécules d'eau sont remplacées par des molécules de tréhalose lors de la déshydratation (Figure 19A). Pour cela, des liaisons hydrogène s'établissent entre les groupements -OH des molécules de tréhalose et les groupements phosphate des têtes polaires des phospholipides ou les groupes polaires des acides aminés (Crowe et al. 1984), permettant de stabiliser les structures. Le troisième mécanisme est l'exclusion préférentielle dans laquelle le tréhalose est exclu de l'environnement proche des macromolécules afin de préserver une couche d'hydratation autour de ces dernières permettant le maintien de leur conformation lors de la déshydratation (Figure 19B).

Les levures ont la capacité de produire du tréhalose lors de conditions stressantes. Cette capacité est utilisée par les industriels pour obtenir des levures sèches actives qui peuvent être conservées sur des périodes allant jusqu'à plusieurs années. Les conditions de production industrielles conduisent à une accumulation de tréhalose intracellulaire à de fortes concentrations (jusqu'à 20% de la matière sèche). Ces concentrations de tréhalose associées à des niveaux de déshydratation poussés ( $a_w \approx 0,15$ ) permettent la conservation des levures sur plusieurs années. Le maintien d'un tel niveau de déshydratation après la production des levures n'est cependant pas évident car les étapes de stockage et de transport sont souvent réalisées dans des conditions de température et d'humidité fluctuantes. L'étude que nous avons menée a cherché à caractériser et comprendre l'impact de ces fluctuations sur la survie et la conservation de levures sèches.

Les travaux menés ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Pauline Ribert financée par un dispositif CIFRE. Cette thèse a été réalisée en collaboration avec la société Phileo, filiale de Lesaffre, ce qui a permis de travailler sur des levures produites industriellement avec des fortes concentrations intracellulaires en tréhalose et séchées dans des conditions optimisées jusqu'à une  $a_w$  de 0,12. À température ambiante, les levures issues de cette production se trouvent dans un état vitreux propice à une conservation longue. Les matrices vitreuses sont caractérisées par la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) qui correspond à la température à laquelle se produit une transition entre l'état vitreux et l'état non vitreux, appelé état caoutchoutique. Cette transition est marquée par un changement fort de la viscosité de la matrice. La  $T_g$  d'une matrice dépend de sa teneur en eau. Celle-ci diminue lorsque l'activité de l'eau de la matrice augmente. Ainsi, les cellules sèches qui s'humidifient au contact d'air humide peuvent subir un phénomène de dévitrification à température ambiante. Pour étudier ce phénomène, des levures sèches ont été équilibrées avec des airs à différentes humidités relatives conduisant à différentes activités de l'eau pour les échantillons. La  $T_g$  de ces différents échantillons a ensuite été estimée par analyse enthalpique différentielle (Figure 20).

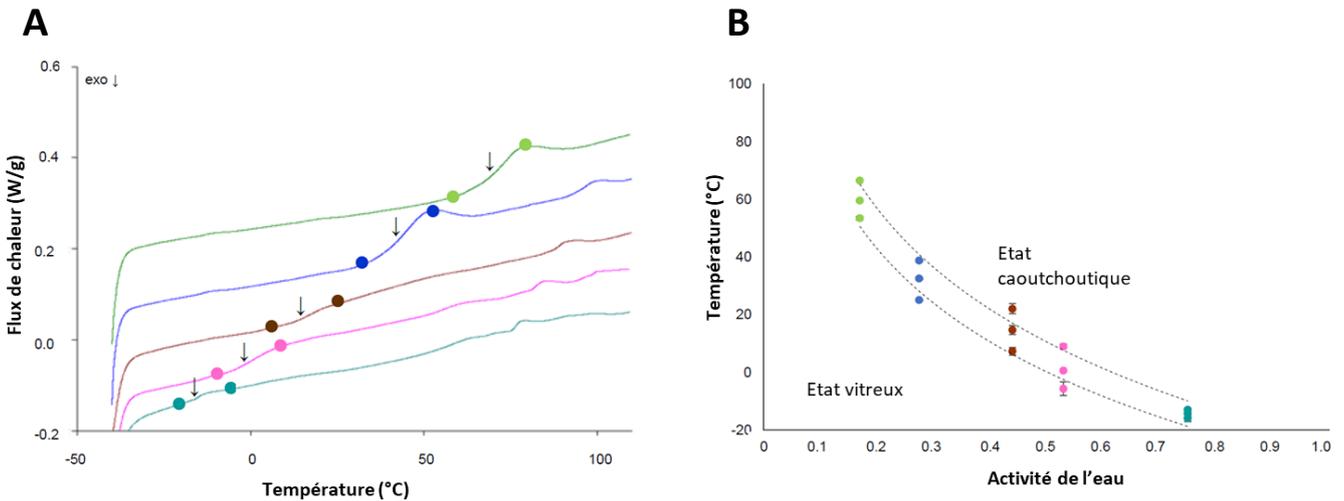


Figure 20. Transition vitreuse de levures sèches équilibrées dans différentes humidités relatives. (A) Courbes de transition vitreuse pour les levures équilibrées à des humidités relatives de 12% (—); 33% (—), 43% (—), 55% (—) et 75% (—). Les points indiquent le début et la fin de la transition vitreuse. Les flèches pleines indiquent le point médian de la transition vitreuse. (B) Valeurs moyennes de Tg (début, milieu et fin) des échantillons hydratés à 12% HR (●), 33% HR (●), 43% HR (●), 55% HR (●) et 75% HR (●) représentées sur un diagramme température vs activité de l'eau. Les courbes en pointillés représentent le début et la fin du phénomène de transition vitreuse (Ribert et al. 2021).

À température ambiante (25 °C), les résultats obtenus montrent que la matrice cellulaire des levures équilibrées avec des airs à des humidités relatives de 55% et 75% se présente dans un état caoutchoutique. Pour 33%, les levures se situent dans la zone de transition vitreuse. Seules les levures équilibrées avec l'air à 12% d'humidité relative sont dans un état vitreux. La stabilité des levures a ensuite été estimée en mesurant l'évolution de la cultivabilité des levures au cours d'un stockage à 25 °C.

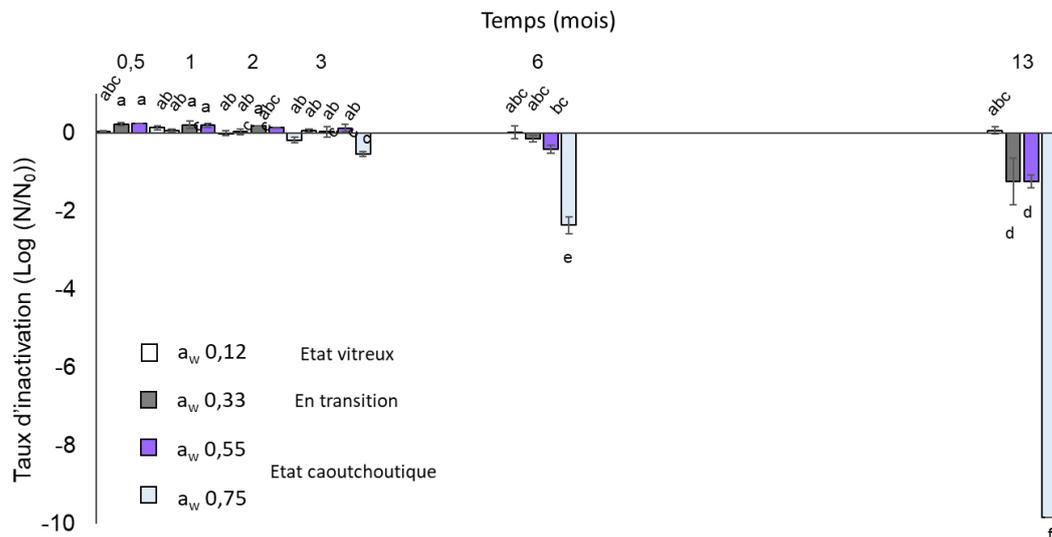


Figure 21. Stabilité des levures sèches équilibrées avec des airs à différentes humidités relatives. Les valeurs moyennes du taux d'inactivation (Log(N/N<sub>0</sub>)) et les écarts types sont présentés. Les lettres associées aux conditions étudiées indiquent des différences significatives (p < 0,05) déterminées par le test de Tukey (Ribert et al. 2021).

La viabilité des levures équilibrées à 12% n'a pas été affectée sur le temps de stockage le plus long étudiée dans notre travail (13 mois) confirmant la forte stabilité des levures lorsqu'elles sont dans un état vitreux. À l'inverse, la survie des levures équilibrées avec la condition d'humidité la plus élevée (75%) diminue avec une réduction d'environ 9 log au bout de 13 mois. Pour les conditions

d'humidités intermédiaires, la perte de cultivabilité est inférieure à 0,5 log après 6 mois et d'environ 1 log au bout de 13 mois. Ce résultat indique que l'état caoutchoutique peut également être compatible avec la conservation de levures sur plusieurs mois à température ambiante.

Dans le cadre de la conservation de micro-organismes, les niveaux de déshydratation intermédiaires et l'état caoutchoutique n'ont été que faiblement étudiés en comparaison des déshydratations poussées qui sont généralement associées à la conservation à long terme. Notamment, l'état caoutchoutique correspond à des conditions dans lesquelles la concentration en tréhalose est supérieure à sa limite de solubilité et dans lesquelles il devrait normalement cristalliser (Figure 22).

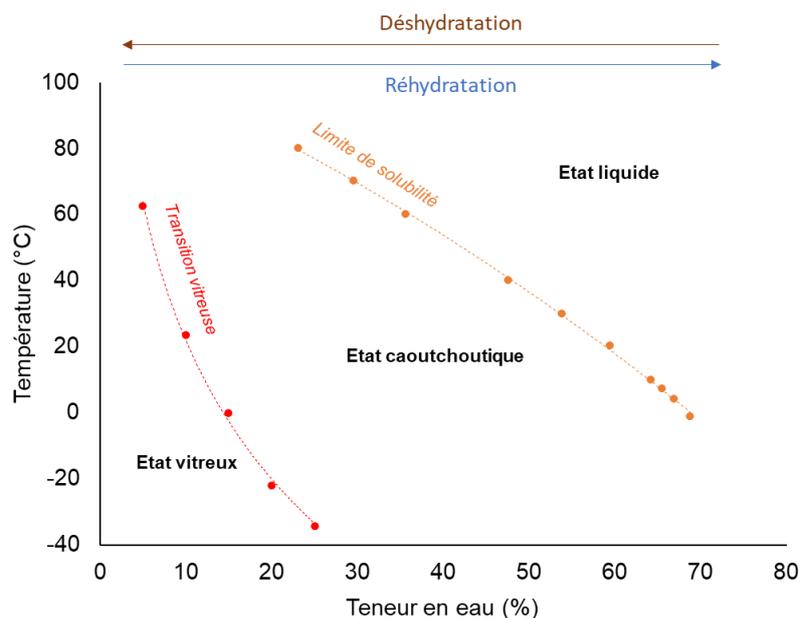


Figure 22. Diagramme de phase du tréhalose. La courbe orange correspond à la limite de solubilité du tréhalose (Miller et al. 1997). La courbe en rouge correspond à la courbe de transition vitreuse (Chen et al. 1999) (D'après (Ribert 2021)).

Dans le cas de la stabilisation de micro-organismes par congélation, l'état vitreux peut être atteint sans cristallisation si la diminution de température est très rapide. Dans le cas du séchage, les cinétiques de retrait de l'eau cellulaire sont plus lentes. Par exemple, l'extraction de l'eau d'une solution de tréhalose conduit à la cristallisation du tréhalose. Nous avons donc cherché à comprendre quels mécanismes étaient à l'origine de l'absence de la cristallisation du tréhalose dans les niveaux d'hydratation intermédiaires. Dans le cas de levures produites industriellement, le tréhalose représente environ 20% de la matière sèche et le reste est principalement composé de protéines. Nous avons donc réalisé des mélanges de tréhalose avec des protéines extraites de levures, déshydrater ces mélanges et analyser la cristallisation du tréhalose en fonction de la composition des mélanges (Figure 23).

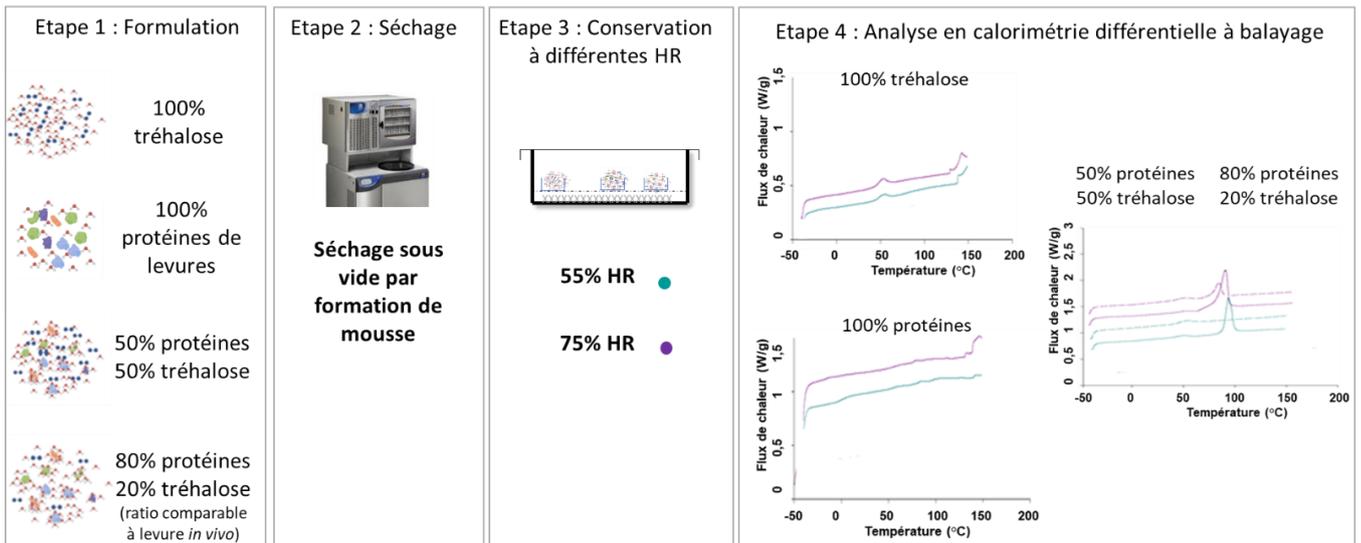


Figure 23. Schéma des étapes appliquées pour étudier le rôle des protéines dans l'inhibition de la cristallisation du tréhalose lors de déshydratations à des niveaux intermédiaires (Ribert 2021).

Les résultats obtenus sur les taux de cristallisation des différents mélanges sont présentés dans la Figure 24. En l'absence de protéine, le tréhalose est totalement cristallisé après équilibrage à des humidités intermédiaires (humidités relatives de 55% et 75%). En revanche, l'ajout de protéines conduit à une inhibition de la cristallisation du tréhalose. Cet effet est le plus marqué pour le ratio 80% de protéines / 20% de tréhalose qui s'approche de la composition des levures industrielles. Ce résultat montre que le tréhalose n'est pas le seul composé clé dans la vitrification de la matrice cellulaire mais que les protéines ont également un rôle important au travers de leur effet inhibiteur de la cristallisation. L'hypothèse pour expliquer cet effet est que la concentration des protéines pendant la déshydratation limite les possibilités de déplacement et de réarrangement des molécules de tréhalose pour former une structure cristalline.

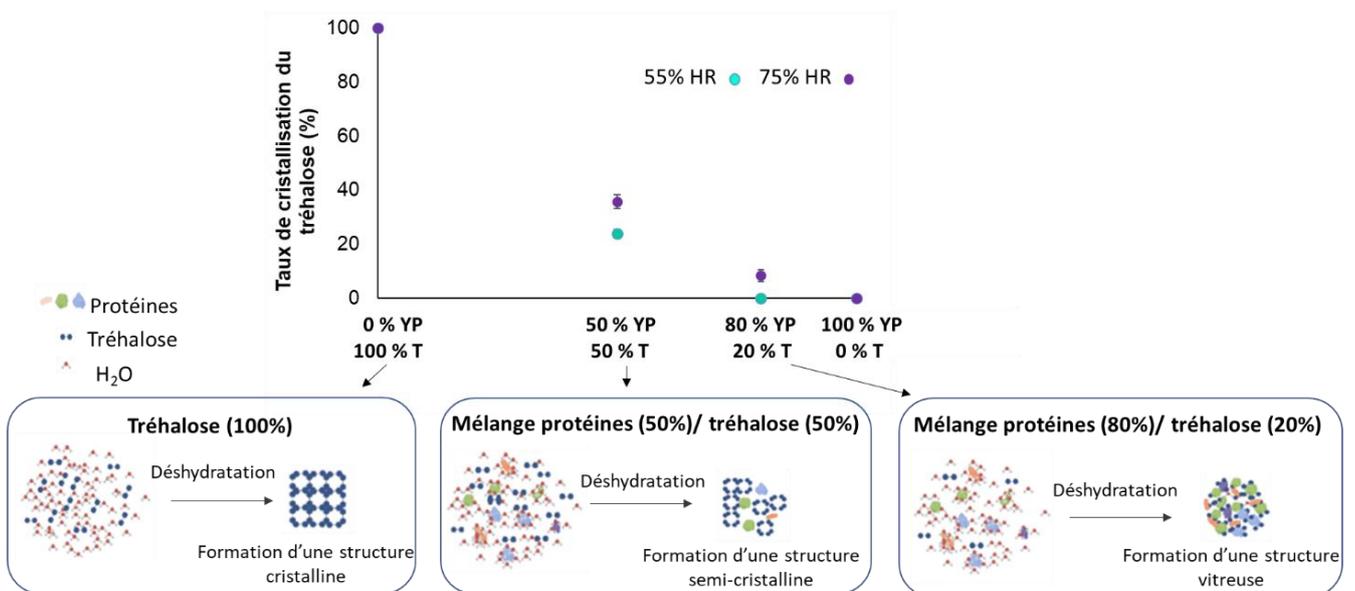


Figure 24. Pourcentage de cristallisation de mélanges tréhalose/protéines lors de déshydratations à des niveaux intermédiaires. L'évolution de la structure des différents mélanges est schématisée (Ribert 2021).

**Les travaux de la littérature portant sur le rôle du tréhalose dans la vitrification et la stabilisation de cellules biologiques sont abondants. Ces travaux focalisent principalement sur des niveaux de déshydratation sévères généralement considérés comme les plus favorables pour la conservation à long-terme. Nos travaux ont permis de compléter cette connaissance en étudiant des niveaux de déshydratation intermédiaires pour lesquels peu d'études étaient disponibles. D'un point de vue fondamental, nos travaux ont permis de mettre en avant le rôle des protéines cellulaires dans l'inhibition de la cristallisation du tréhalose permettant sa vitrification. D'un point de vue appliqué, ces résultats permettent de mieux prédire la stabilité de levures sèches soumises à des fluctuations hydriques et thermiques de leur environnement.**

**Publication liée aux travaux présentés dans cette partie :**

- Ribert, P., **Dupont, S.**, Roudaut, G., & Beney, L. (2021). Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 105, 6409-6418.

### 3.3.2. Bactéries probiotiques : de la production à la mise en forme

L'ingestion de bactéries en vue de bénéfices pour la santé humaine apparaît dans le début du XX<sup>ème</sup> siècle. Cette idée a été initialement développée par le pédiatre Henry Tissier (1866-1926) qui rapportait que l'ingestion de bifidobactéries pouvaient jouer un rôle dans la guérison de la gastro-entérite chez le nourrisson (Ozen and Dinleyici 2015). L'essor de cette idée interviendra cependant quelques années plus tard avec les travaux d'Elie Metchnikoff (1845-1916) qui avait observé que certaines populations des Balkans, dont les régimes alimentaires étaient riches en produits laitiers fermentés, avaient des durées de vie plus longues que celles qui n'en consommaient pas. Il encourage alors la consommation de yaourts dans lesquels les ferments lactiques joueraient un rôle contre le vieillissement. Depuis, de nombreuses études ont mis relation diverses pathologies et une dysbiose du microbiote intestinal. Il est ainsi supposé que l'ingestion de bactéries d'intérêt dans le but de rétablir l'équilibre intestinal pourrait permettre de jouer un rôle dans la guérison de ces maladies et sur le bien-être de l'homme. À cause de la lourdeur et de la complexité de la mise en œuvre d'études cliniques à grandes échelles, les preuves scientifiques des effets bénéfiques sur la santé de l'homme sont cependant actuellement encore minces. De plus, pour certaines bactéries commensales du tractus gastro-digestif humain présentant un potentiel bénéfique, les conditions de production de biomasse compatibles avec la réglementation permettant leur ingestion ne sont pas connues. Ceci représente ainsi un verrou à lever pour réaliser des études cliniques et envisager l'utilisation de ces bactéries par le secteur industriel.

Les applications impliquant l'utilisation de micro-organismes bénéfiques pour la santé humaine concernent principalement deux marchés : les compléments alimentaires et les médicaments. Bien que soumis à des réglementations différentes d'un point de vue de la démonstration des effets, le processus de production industrielle des bactéries pour ces deux marchés est similaire et comporte les mêmes étapes (Figure 25).



Figure 25. Schéma des principales étapes liées à l'utilisation industrielle de micro-organismes d'intérêt.

L'équipe PMB focalise ses travaux sur deux de ces étapes : la production ainsi que la stabilisation et la mise en forme de la biomasse bactérienne. Depuis mon recrutement au sein de cette équipe, une partie de mon travail de recherche a été réalisée sur ces thèmes. Ces travaux de recherche ont été menés au travers de deux thèses. La première est une **thèse réalisée par Audrey Raise (2017-2021), que j'ai co-dirigé (co-direction 50% avec Laurent Beney)**, dans le cadre du **projet ANR DOPEOS** (Development and Optimization of Production process of Extremely Oxygen Sensitive bacteria for their industrial exploitation). Ce projet, regroupant deux partenaires académiques (UMR PAM et UMR Micalis) et deux partenaires industriels (Global Process Concept et Biovitis), avait pour but de développer des outils et des procédés de production et de stabilisation pour la mise en œuvre industrielle de bactéries d'intérêt extrêmement sensibles à l'oxygène. La seconde thèse portant sur ces thèmes est la **thèse d'Aurore Bodzen (2017-2021) pour laquelle j'ai participé à l'encadrement**. Cette thèse a été financée par un **dispositif CIFRE** et a été réalisée avec l'entreprise **Indigo Therapeutics** spécialisée dans le développement de compléments alimentaires fonctionnels. Ce travail de thèse visait à optimiser la production de bactéries lactiques probiotiques sous forme déshydratée. Les bactéries ciblées présentaient un potentiel satiétogène ou un effet dans la réduction de l'hyper-perméabilité membranaire des cellules intestinales.

Les travaux réalisés lors de ces deux thèses sont liés à des partenaires industriels et certains résultats confidentiels ne peuvent pas être présentés dans ce manuscrit. Les résultats sont présentés dans deux parties dont la première concerne la production de la biomasse et la seconde la stabilisation et la mise en forme des bactéries.

### 3.3.2.1. Développement de milieux de production de biomasse compatibles avec une utilisation industrielle des bactéries

- Formulation d'un milieu pour la production de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène

Les travaux de l'ANR DOPEOS visaient à développer des connaissances sur les bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène pour définir des conditions de production et de stabilisation en vue d'une application industrielle. Les travaux se sont centrés sur une bactérie modèle, la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*. Cette bactérie représente environ 5% du microbiote intestinal des humains sains, faisant d'elle l'une des bactéries les plus abondantes du tube digestif. Elle présente des effets anti-inflammatoires (Sokol et al. 2008) et est considérée aujourd'hui comme l'une des bactéries les plus prometteuses en tant que probiotiques de nouvelle génération. Elle pourrait avoir des applications dans le traitement de diverses maladies dont principalement les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Avant le démarrage du projet DOPEOS, les études menées sur cette bactérie étaient déjà nombreuses mais portaient exclusivement sur son lien avec diverses pathologies lors de dysbiose et sur les mécanismes cellulaires qui pourraient lui conférer un effet bénéfique sur la santé. Dans ces études, la production des bactéries était réalisée en petits volumes (quelques mL) dans des milieux de laboratoire (YCFAG et LYHBHI) peu performants (CFU/mL de l'ordre de  $10^8$ ) et incompatibles avec une ingestion humaine car contenant des composés d'origine animale non autorisés.

Un des objectifs du projet DOPEOS était de formuler un milieu compatible pour la production industrielle de *F. prausnitzii* en bioréacteur. La démarche appliquée est résumée dans la Figure 26. Cette démarche consistait à substituer certains composés du milieu LYHBHI et à évaluer les effets de ces substitutions sur la croissance des bactéries par suivi de la densité optique des cultures bactériennes. Le choix des composés de substitution s'est notamment appuyé sur les données disponibles sur le métabolisme et les besoins nutritionnels de la bactérie.

#### Objectif

- |   |  |    |   |
|---|--|----|---|
| <p>Formuler un milieu adapté à la culture de <i>F. prausnitzii</i> A2-165</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Performant (bons rendements en biomasse)</li> <li>• Sans composé d'origine animale, OGM, allergène</li> <li>• Respectant la réglementation sur l'alimentation humaine</li> <li>• Industrialisable</li> <li>• Economiquement compétitif</li> <li>• Améliorant/Maintenant la fonctionnalité de la bactérie et sa survie lors du séchage et du stockage</li> </ul> | en | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Partant du milieu LYHBHI</li> <li>• Exploitant les données disponibles sur le métabolisme et les besoins nutritionnels de <i>F. prausnitzii</i></li> </ul> |
|---|--|----|---|

#### Démarche suivie

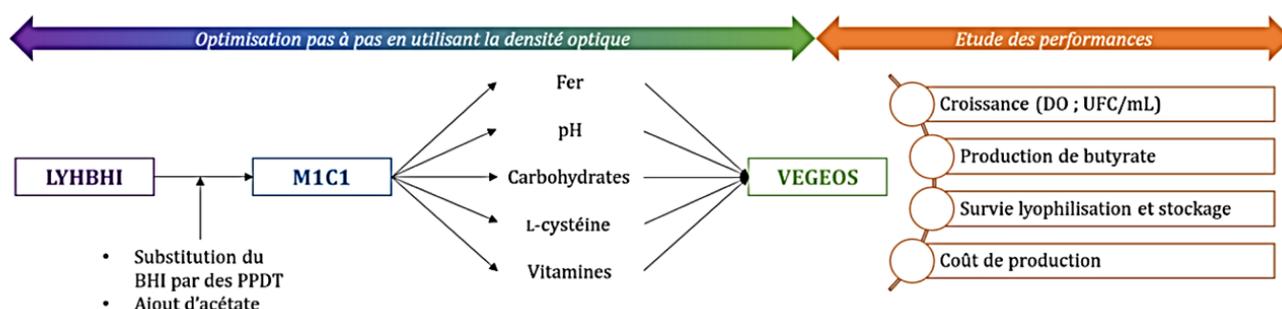


Figure 26. Objectif et démarche suivie pour formuler le milieu de culture VEGEOS. BHI correspond à une infusion coeur-cerveille ; PPDT correspond à des peptones de pommes de terre (Raise 2021).

Ce travail a permis d'aboutir à la formulation d'un milieu basée sur des peptones végétales (pommes de terre). Ce milieu, que nous avons appelé VEGEOS, satisfait toutes les exigences réglementaires associées à un milieu de production pour des bactéries probiotiques. Il présente également des performances en termes de vitesse de croissance et de biomasse finale obtenue en fin de culture supérieures à celle du LYHBHI. La concentration bactérienne maximale obtenue à 12 heures de culture atteint environ  $2 \cdot 10^9$  UFC/mL (Figure 27C).

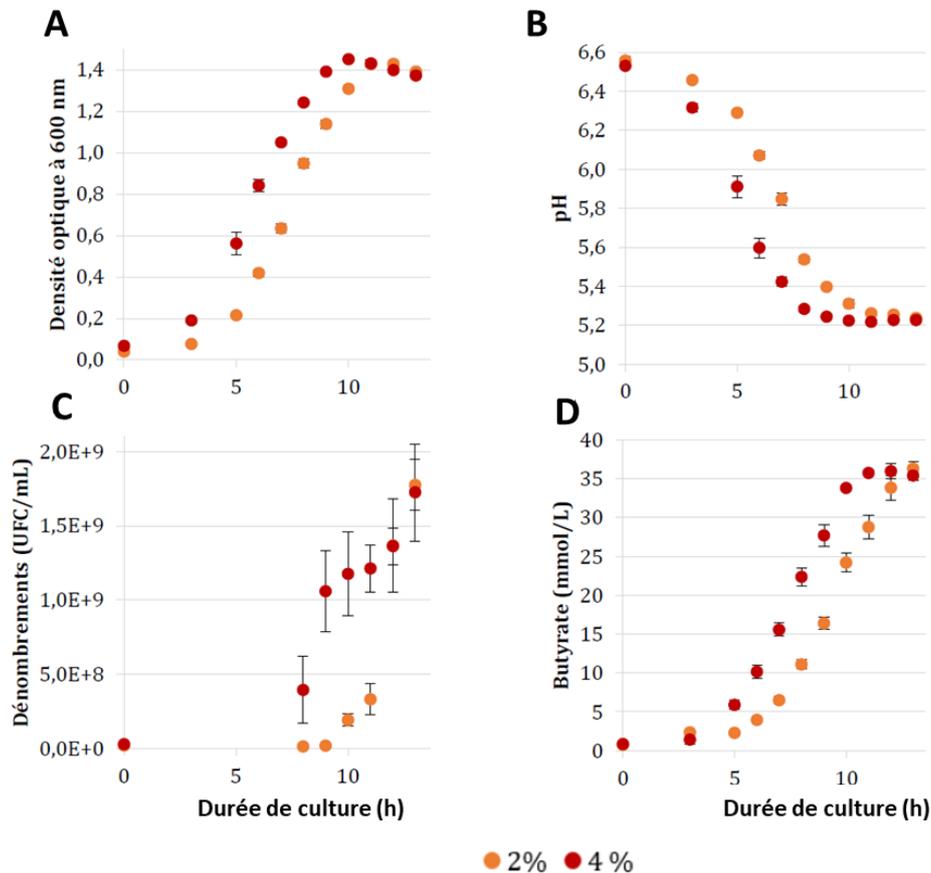


Figure 27. Performances de croissance de *F. prausnitzii* cultivée dans du milieu VEGEOS, en anaérobiose à 37 °C. Quatre paramètres ont été suivis : (A) la densité optique à 600 nm, (B) le pH, (C) la concentration en bactéries cultivables par dénombrements (UFC/mL) et (D) la production de butyrate. Ces suivis ont été réalisés pour des cultures ensemencées à 2% (orange) et à 4% (rouge). n=3 (Raisé 2021).

Ce milieu permet également d'obtenir une bonne production de butyrate (35 mM) (Figure 27D) en comparaison de celle observée en milieu LYHBHI (6,5 mM, résultat non montré). Cette production plus importante est à relier à la présence de concentrations optimisées d'acétate et de carbohydrates dans le milieu VEGEOS (Heinken et al. 2014). Cette production est intéressante puisque le butyrate est considéré comme un des composés impliqués dans l'action bénéfique de bactéries probiotiques. Le milieu VEGEOS présente enfin l'avantage de ne pas former de mousse lors de la culture en bioréacteur.

- Influence du milieu de culture sur la résistance des bactéries aux procédés de stabilisation

La formulation d'un milieu de culture s'attache généralement à produire un maximum de bactéries dans un minimum de temps. Cependant, la nature du milieu de culture ainsi que les conditions de culture peuvent également influencer sur la résistance des bactéries. D'un point de vue industriel, l'augmentation de la résistance des bactéries est un mécanisme d'intérêt puisqu'il peut permettre d'augmenter la survie des bactéries lors de la mise en œuvre du procédé de stabilisation (Huang et al. 2016). En effet, la déshydratation et la congélation sont à l'origine de contraintes sur les membranes cellulaires pouvant conduire à la mort des cellules. Il a été montré que des stress acides réalisés pendant ou après culture peuvent augmenter la survie de souches de bactéries lactiques à des procédés de congélation (Beal et al. 2001; Wang et al. 2005) et de lyophilisation (Palmfeldt and Hahn-Hägerdal 2000; Shao et al. 2014). Ce mécanisme de protection croisée a été observé pour des souches d'*Oenococcus oeni* et des souches de lactobacilles mais pas pour des souches de lactocoques.

Une partie des travaux réalisés lors de la thèse d'Aurore Bodzen s'intégrait dans le programme OPTALIM qui impliquait l'UMR PAM, l'UMR MICALIS et la société Indigo Therapeutics. Ce programme visait à optimiser la production et la stabilisation de souches probiotiques ayant un effet limitant la prise pondérale chez l'Homme. La souche *Lactococcus lactis* NZ9000 a été utilisée car elle présente un effet satiétogène (Bermúdez-Humarán et al. 2007). Cette souche dérive de la souche *L. lactis* NCDO 712, également utilisée dans notre étude pour son potentiel satiétogène. L'effet d'un stress acide pendant la culture sur la résistance à la lyophilisation de ces deux souches de bactérie a été étudié. L'hypothèse est que les conditions de pH du milieu de culture peuvent modifier la composition et les propriétés de la membrane plasmique impactant ainsi la résistance des bactéries au procédé de stabilisation. En effet, la composition de la membrane influence la fluidité de la membrane plasmique et affecte la survie des bactéries lors d'un séchage et de la conservation à l'état sec (Fonseca et al. 2019). Pour tester l'hypothèse, deux milieux de culture différents conduisant à des valeurs de pH différentes lors de la culture ont été utilisés : le milieu MRS pour lequel la valeur de pH avant culture est de 5,8 et atteint 4,8 en fin de culture, et le milieu gM17 pour lequel la valeur de pH avant culture est de 7 et atteint 5,4 en fin de culture.

Les résultats obtenus ont montré que la survie des deux souches de bactérie à la lyophilisation dépendait du milieu de culture utilisé. La survie est plus forte lorsque les bactéries sont cultivées dans le MRS, milieu le plus acide. À titre d'exemple, la survie à la lyophilisation de la souche NCDO 712 est totale après culture en milieu MRS alors qu'environ la moitié de la population bactérienne meurt après culture en milieu gM17 (Figure 28A). La membrane plasmique étant une cible majeure lors de la lyophilisation, l'impact de la nature du milieu de culture sur la fluidité membranaire a été caractérisé. Pour cela, l'anisotropie d'une sonde fluorescente (diphénylhexatriène, DPH) incorporée dans les membranes bactériennes a été mesurée. La valeur d'anisotropie reflète la fluidité de la membrane : une augmentation de cette valeur correspond à une membrane plus rigide. La comparaison des valeurs d'anisotropie des bactéries cultivées dans

les deux milieux a révélé que le milieu MRS permet une fluidité membranaire des deux souches plus importantes que le milieu gM17 (Figure 28B). La fluidité plus grande de la membrane après culture en milieu MRS peut s'expliquer par un ratio lipides insaturés/lipides saturés plus grand que celui après culture en milieu gM17. Il a été montré chez *Lactobacillus acidophilus* qu'un stress acide est à l'origine d'une modification du métabolisme bactérien et augmente ce ratio (Wang et al. 2005). La première étape de la lyophilisation est une congélation qui impose de refroidir les bactéries. La diminution de température conduit à une rigidification des membranes biologiques pouvant conduire à une altération de la bicouche lipidique. L'effet bénéfique du milieu MRS sur la survie à la lyophilisation pourrait ainsi en partie s'expliquer par la limitation de la rigidification de la membrane plasmique lors de la phase de refroidissement des cellules (Figure 28C).

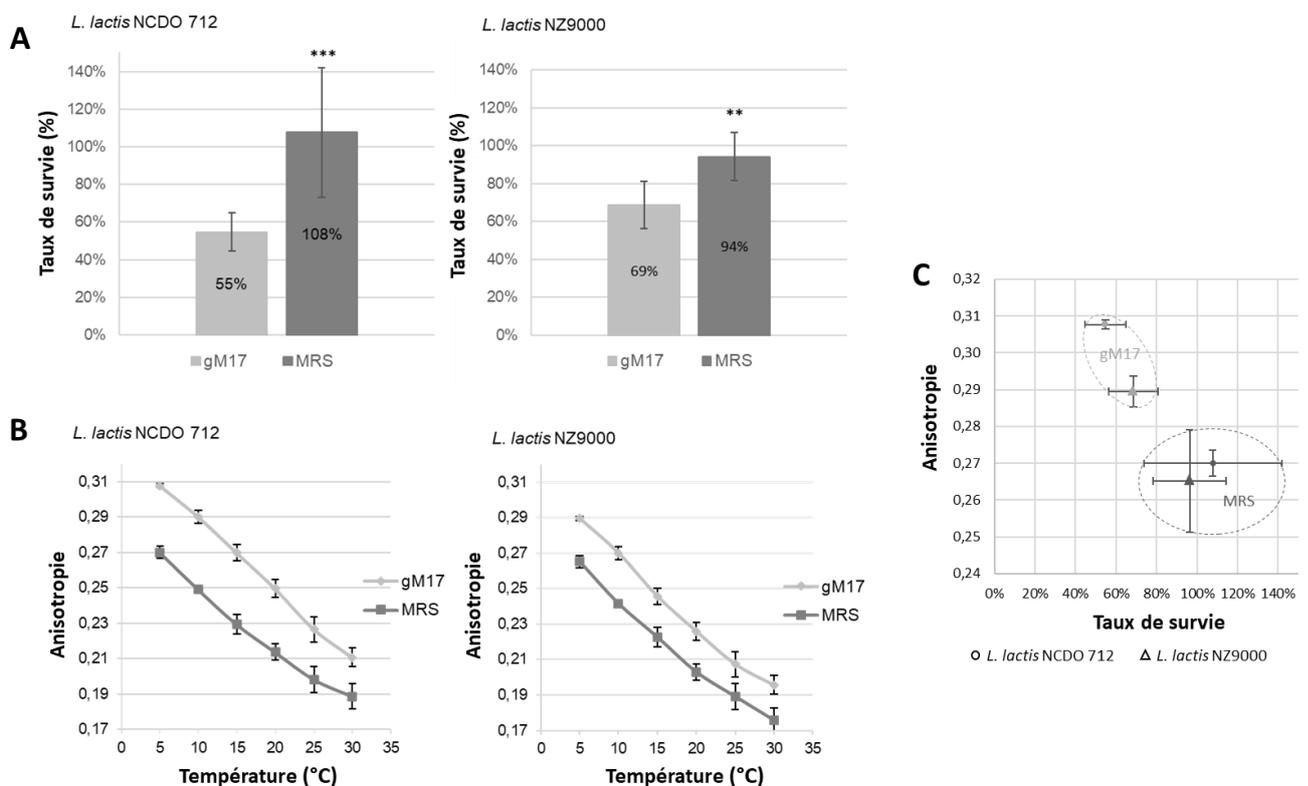


Figure 28. Impact de la nature du milieu de culture sur la survie de *L. lactis* à la lyophilisation. (A) Taux de survie après lyophilisation. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux conditions (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ , ANOVA). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type obtenu à partir de triplicats indépendants. (B) Evaluation de la fluidité membranaire en fonction de la température par anisotropie de fluorescence. (C) Diagramme reliant l'anisotropie de fluorescence des bactéries à 5°C et le taux de survie à la lyophilisation (Bodzen et al. 2021a).

**La production industrielle de bactéries probiotiques requiert l'utilisation de milieux de culture performants compatibles avec les contraintes réglementaires associées à l'alimentation humaine. Les travaux présentés ont montré que la compréhension du métabolisme bactérien peut permettre de développer et d'optimiser des milieux de production pour des bactéries d'intérêt.**

**Publications et brevets liés aux thèmes des travaux présentés dans cette partie :**

- Bodzen, A., Iaconelli, C., Charriau, A., **Dupont, S.**, Beney, L., & Gervais, P. (2020). Specific Gaseous Conditions Significantly Improve *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli* Survival to Freeze Drying and Rehydration. *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY*, 7(1), 2+.
- Bodzen, A., Jossier, A., **Dupont, S.**, Mousset, P.-Y., Beney, L., Lafay, S., & Gervais, P. (2021). Increased Survival of *Lactococcus lactis* Strains Subjected to Freeze-Drying after Cultivation in an Acid Medium : Involvement of Membrane Fluidity. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 59(4).
- Gervais, P., Lafay, S., **Dupont, S.**, Beney, L., Mousset, P-Y., Bodzen, A. (2021) Brevet d'invention (FR3108122A1) : Milieu de culture alimentaire. Ce brevet décrit l'utilisation d'un milieu de culture de qualité alimentaire pour la production de bactéries lactiques destinées à une utilisation alimentaire ou pharmaceutique.
- Beney, L., Raise A., **Dupont, S.** (2022) Brevet d'invention (FR3118059A1) : Milieu de culture, procédé de fabrication et procédé de culture bactérienne. Ce brevet décrit la fabrication d'un milieu et les conditions de culture pour la production de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène (Brevet étendu à l'international (WO2022129616A1)).

*3.3.2.2. Stabilisation et mise en forme de bactéries d'intérêt probiotiques*

- Formulation d'un milieu de protection pour la conservation des bactéries

Après la production de la biomasse bactérienne, cette dernière est rarement utilisée directement et doit donc être stabilisée afin de conserver sa viabilité et sa fonctionnalité. En fin de culture, les bactéries sont concentrées avant d'être stabilisées par déshydratation ou congélation. La déshydratation est généralement la technique privilégiée dans les applications industrielles car elle présente l'avantage de pouvoir ensuite conserver les bactéries à température ambiante. La conservation sur des périodes longues, pouvant aller jusqu'à deux ans dans le cas de produits probiotiques, requiert cependant des niveaux de déshydratation poussés. En effet, lorsque la concentration en eau n'est pas suffisamment basse, certaines enzymes cellulaires sont encore actives et peuvent participer à la dégradation des cellules. Des enzymes comme les protéases et les oxydases fonctionnent jusqu'à des activités de l'eau de 0,45. Ce niveau de déshydratation n'est cependant pas suffisant car les réactions d'oxydation non-enzymatiques et de Maillard peuvent encore se produire à ce niveau. Il est ainsi nécessaire de déshydrater les cellules jusqu'à des niveaux sévères correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,1.

L'activité de l'eau est un paramètre qui reflète la disponibilité de l'eau pour les réactions biologiques et chimiques. Même s'il est en relation avec la teneur en eau, ce paramètre n'est pas équivalent et dépend également des interactions que l'eau réalise avec les composés avec lesquels elle est en contact. Dans le cadre de la thèse d'Aurore Bodzen, la stabilité après séchage de bactéries lactiques a été étudiée en fonction de l'ajout de différents adjuvants de séchage pouvant influencer sur l'activité de l'eau finale des échantillons. Pour cela, des bactéries *Lactiplantibacillus plantarum* ont été séchées par lyophilisation en présence de saccharose auquel a été ajouté de

l'inuline, de la caséine micellaire ou du lactosérum. Le saccharose seul correspondait à la condition contrôle. Ce disaccharide non réducteur est couramment utilisé dans les procédés de lyophilisation pour obtenir une matrice vitreuse à l'issue du séchage pour permettre la conservation des bactéries.

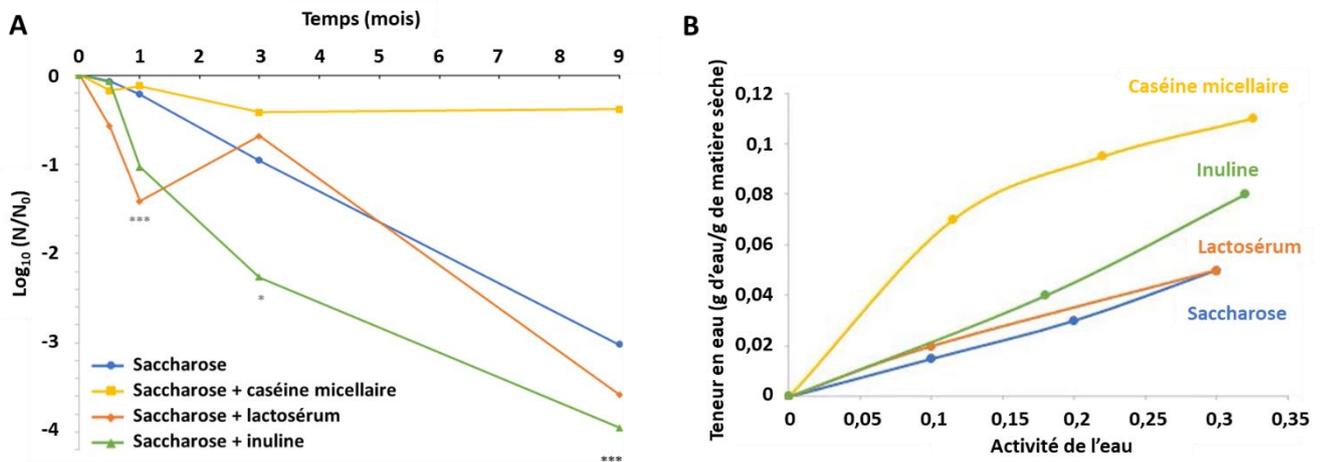


Figure 29. Influence de l'ajout d'adjuvants de séchage sur la stabilité de *L. plantarum* après lyophilisation. (A) Réduction logarithmique *L. plantarum* au cours du temps lors de la conservation à 25 °C. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type obtenu à partir de triplicats indépendants. Les astérisques indiquent une différence significative entre les lyoprotecteurs (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ , ANOVA). (B) Isothermes de sorption du saccharose, de la caséine micellaire lyophilisée, de protéines de lactosérum et de l'inuline. (Bodzen et al. 2021b)

La survie après lyophilisation des bactéries a été évaluée sur une période de 9 mois de conservation (Figure 29A). Au cours du temps de conservation, la viabilité des bactéries déshydratées diminue. Cette diminution est cependant dépendante de l'adjuvant ajouté au saccharose lors de la lyophilisation. La diminution de la survie des bactéries dépasse 2 log au bout de 9 mois pour le saccharose seul ou le saccharose combiné avec l'inuline ou le lactosérum. En revanche, la combinaison saccharose et caséine micellaire a conduit à une perte de viabilité modérée avec 0,5 log à 9 mois de conservation. Afin de comprendre cette différence, la teneur en eau et l'activité de l'eau des différents échantillons ont été mesurées après lyophilisation. Il n'y avait pas de différence concernant la teneur en eau entre les différents échantillons avec une valeur de 0,04 g d'eau/g de matière sèche. En revanche, concernant l'activité de l'eau, il existait des différences, notamment pour l'échantillon contenant la caséine micellaire. Les valeurs obtenues étaient les suivantes : saccharose seul ( $a_w=0,247$ ), saccharose + inuline ( $a_w=0,229$ ), saccharose + lactosérum ( $a_w=0,279$ ) et saccharose + caséine micellaire ( $a_w=0,053$ ) (Résultats non présentés). L'activité de l'eau plus basse atteinte avec la caséine micellaire permet d'expliquer la meilleure conservation des bactéries au cours du temps. L'analyse des isothermes de sorption des différents adjuvants (Figure 29B) permet de comprendre leur effet sur l'activité de l'eau finale des échantillons lyophilisés. En effet, la caséine micellaire se démarque des autres adjuvants puisque pour une même teneur en eau, l'activité de l'eau est beaucoup plus basse. Nos résultats montrent ainsi que l'effet des adjuvants sur l'activité de l'eau finale des échantillons est, avec le niveau de déshydratation, un paramètre clé dans la stabilité de bactéries déshydratées.

- Mise au point de formes galéniques pour préserver la viabilité de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène lors de leur ingestion

En complément de la stabilisation, des étapes de mise en forme sont parfois réalisées en fonction de l'application visée. Dans le cas de bactéries probiotiques destinées à produire des compléments alimentaires ou des médicaments, les bactéries sont intégrées à des comprimés ou à des capsules. Cette étape est indispensable pour permettre leur ingestion et les préserver lors de leur passage dans le tractus gastro-digestif afin qu'elles arrivent viables jusqu'à leur site d'action. En effet, au cours de leur progression dans le tractus gastro-digestif, les bactéries rencontrent des environnements hostiles pouvant conduire à leur mort.

Dans le cadre de la thèse d'Audrey Raise, une étude sur la mise au point d'une méthode d'encapsulation de *F. prausnitzii* a été réalisée. L'originalité de cette étude portait principalement sur l'application de l'encapsulation de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène pour lesquelles les connaissances sur leur résistance aux procédés d'encapsulation ainsi que la protection générée par ces procédés sur ces bactéries n'étaient pas connus. Deux procédés d'encapsulation ont été utilisés : le premier consistait à l'intégration des bactéries fraîches dans des billes d'alginate par gélification ionique suivie d'une étape de lyophilisation ; le second consistait à inclure des bactéries lyophilisées dans une matrice lipidique (Gelucire® 43/01). La première étape de l'étude a consisté à estimer la survie des bactéries, fraîches ou lyophilisées, dans différents tampons mimant les différents compartiments du tractus gastro-digestif (Figure 30A). Concernant les bactéries fraîches, deux compartiments ont conduit à une perte totale de la viabilité bactérienne et sont critiques pour la survie des bactéries : l'estomac et le jéjunum distal. Ces compartiments sont connus pour imposer des conditions drastiques aux bactéries qui passent au travers : dans l'estomac, le pH peut atteindre une valeur de 1 ; dans le jéjunum distal, les bactéries sont en contact des sels biliaires. Cette forte sensibilité de la bactérie à ces deux compartiments s'observe également pour les bactéries lyophilisées. Une perte de viabilité des bactéries lyophilisées a également été observée pour les autres compartiments qui n'avaient pas inactivés les bactéries fraîches. Cet effet peut s'expliquer par la réhydratation des bactéries dans des milieux non optimaux qui peuvent ainsi conduire à la mortalité d'une partie des bactéries.

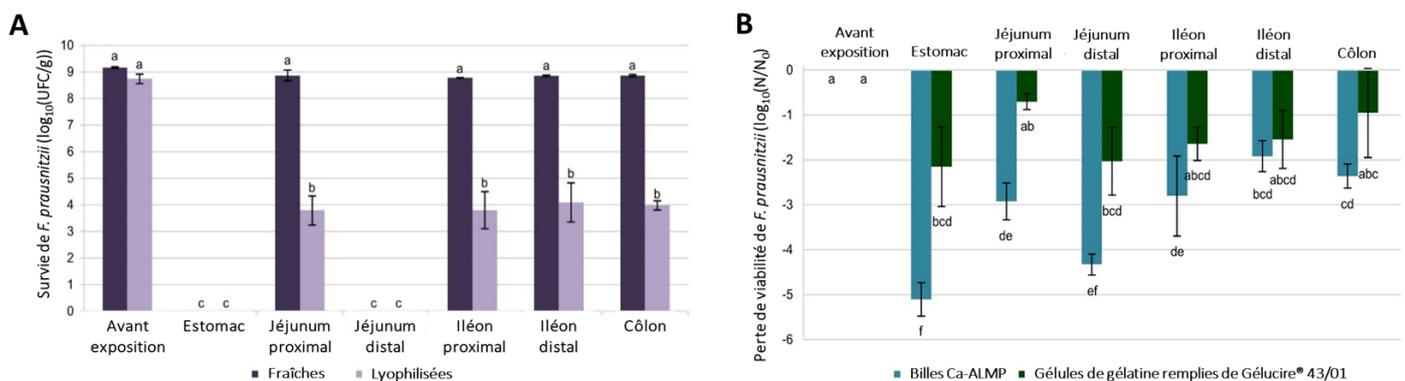


Figure 30. Survie de la bactérie *F. prausnitzii* dans des tampons mimant les compartiments du tractus gastro-digestif humain. (A) Survie de bactéries fraîches ou lyophilisées. (B) Survie des bactéries après le procédé de gélification ionique (billes Ca-ALMP) ou d'inclusion dans une matrice lipidique (Gelucire® 43/01) (Raise et al. 2020).

La survie des bactéries a ensuite été estimée après leur encapsulation par les deux procédés étudiés (Figure 30B). Quel que soit le procédé utilisé, l'encapsulation des bactéries ne permet pas une protection totale des bactéries. Il y a tout de même un effet protecteur de l'encapsulation qui est notamment plus important pour l'inclusion en matrice lipidique en comparaison de celle dans les billes d'alginate. La protection supérieure du procédé d'inclusion en matrice lipidique peut s'expliquer par les propriétés hydrophobes de la Gélucire qui limite la réhydratation des bactéries dans les tampons digestifs. Bien que des optimisations doivent encore être réalisées pour obtenir des taux de survie plus importants, l'inclusion de bactéries en matrice lipidique semble être une voie prometteuse pour la mise en forme de bactéries probiotiques.

**La stabilisation et la mise en forme de la biomasse bactérienne sont des étapes indispensables pour la production industrielle de bactéries probiotiques. Les travaux présentés dans cette partie ont mis en avant le rôle d'adjuvants permettant d'influer sur le niveau d'activité de l'eau et sur la conservation de bactéries déshydratées. Des premiers résultats concernant l'encapsulation de bactéries EOS ont également été produits. L'inclusion des bactéries dans des matrices lipidiques semble particulièrement intéressante pour limiter la réhydratation dans des compartiments du tractus défavorables à la survie de ces bactéries sensibles. Ces connaissances peuvent trouver des applications directes dans les stratégies de production industrielle des bactéries probiotiques.**

**Publications liées aux thèmes des travaux présentés dans cette partie :**

- Allouche, R., **Dupont, S.**, Charriau, A., Gervais, P., Beney, L., & Chambin, O. (2018). Optimized tableting for extremely oxygen-sensitive probiotics using direct compression. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 538(1-2), 14-20.
- Raise, A., **Dupont, S.**, Iaconelli, C., Caliri, C., Charriau, A., Gervais, P., Chambin, O., & Beney, L. (2020). Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 56(A).
- Bodzen, A., Jossier, A., **Dupont, S.**, Mousset, P.-Y., Beney, L., Lafay, S., & Gervais, P. (2021b). Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC BIOTECHNOLOGY*, 21(1), 66.

### 3.3.3. Effet de la lumière visible à haute intensité sur les micro-organismes

La maîtrise des contaminations microbiologiques des aliments est une composante essentielle de la qualité des aliments représentant ainsi un enjeu considérable pour les filières alimentaires. Cette maîtrise est incontournable pour prévenir certaines maladies d'origine alimentaire, permettant ainsi la limitation des dépenses de santé, mais aussi pour réduire les pertes alimentaires liées aux flores d'altération des aliments. Une des solutions actuelles est l'utilisation de molécules chimiques présentant des propriétés fongicides et bactéricides. L'utilisation de ces molécules induit cependant des problèmes environnementaux et toxicologiques importants. De plus, à l'image de la croissance forte du marché des produits biologiques, les consommateurs sont à la recherche de produits faiblement traités et prêts à consommer. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des procédés de décontamination microbienne ne faisant plus appel à ces composés chimiques et permettant d'assurer la sécurité microbiologique des aliments tout en conservant leur qualité.

Dans le domaine agro-alimentaire, les procédés de maîtrise des contaminations microbiennes ne se basant pas sur l'utilisation de fongicides ou de bactéricides, reposent principalement sur l'utilisation de traitements thermiques (pasteurisation, stérilisation). Ces procédés sont cependant à l'origine d'une altération des qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments et ne peuvent pas être utilisés sur tous aliments, notamment les aliments frais. Les rayonnements ultraviolets, notamment les UVc ( $\lambda \approx 100-280$  nm), sont également parfois utilisés pour décontaminer les aliments. Cependant, la faible pénétration de ce type de rayonnement au niveau de l'eau nécessite des puissances importantes pour obtenir un traitement efficace sur certains types d'aliment. L'effet mutagène de ce rayonnement est également un inconvénient à leur utilisation. Les recherches académiques sur la résistance des micro-organismes à des perturbations physiques et environnementales, notamment au sein de l'UMR PAM, permettent d'envisager des procédés alternatifs pour maîtriser les populations microbiennes. Parmi ces alternatives, je travaille à développer, depuis mon recrutement au sein de l'équipe PMB, une thématique portant sur l'étude de l'effet de la lumière visible à Ultra Haute Intensité (UHI) sur les micro-organismes afin de développer un procédé d'inactivation microbienne qui pourrait être appliqué à des surfaces de contact alimentaire ou à des aliments.

Les travaux présentés dans cette partie ont reposé principalement sur 3 projets d'envergure croissante : projet AgroSup Dijon (2017-2018, 10 k€), projet de maturation Sayens IDLux (2018-2020, 130 k€) et le projet ANR Jeune Chercheur GreenDeconta (2019-2021, 174 k€). Les moyens alloués par ces projets m'ont permis de **superviser le travail de 3 post-doctorants (Cédric Grangeteau, Emilie Lang et Thibaut Théry)**. Les résultats sont présentés dans 3 parties. La première concerne la compréhension des effets de la lumière UHI sur les cellules. La seconde est dédiée au développement d'un réacteur pilote basé sur l'utilisation de LED. La dernière partie présente l'étude de l'inactivation de spores de champignons et de bactéries d'altération des aliments par l'application de lumière UHI.

### 3.3.3.1. Effets cellulaires de traitements lumineux à très haute intensité

Les rayonnements électromagnétiques sont capables d'interagir avec la matière organique et peuvent par conséquent avoir des effets sur les cellules biologiques. Notamment, la lumière visible peut être utilisée pour maîtriser la viabilité et certaines activités cellulaires des champignons (Fuller et al. 2015). Les travaux portant sur l'utilisation de la lumière visible dans l'objectif d'inactiver des micro-organismes sont nombreux. La photo-oxydation est le principal mécanisme conduisant à l'inactivation microbienne. Ce mécanisme repose sur l'interaction de la lumière avec des molécules photo-sensibilisatrices qui, lorsqu'elles sont excitées à une longueur d'onde spécifique qui leur est propre, peuvent transférer leur énergie d'excitation électronique à l'oxygène pour former de l'oxygène singulet. L'oxygène singulet est une espèce réactive de l'oxygène qui peut directement altérer les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Concernant les micro-organismes, l'effet létal est principalement observé sur une plage de longueurs d'onde comprise entre 400 et 430 nm (Gwynne and Gallagher 2018). Ces longueurs d'onde sont utilisées pour exciter les porphyrines qui sont des photosensibilisateurs endogènes. Les mécanismes cellulaires et les cibles de l'oxygène singulet ne sont cependant pas totalement compris. Certains travaux ont montré que la mort de micro-organismes est liée à des dommages membranaires (McKenzie et al. 2016; Biener et al. 2017) alors que d'autres ont mis en avant une oxydation de l'ADN (Kim and Yuk 2017; Yoshida et al. 2017) ou des modifications génétiques sans altération de la membrane (Kim and Yuk 2017). La plupart de ces travaux ont étudiés l'effet de la lumière visible par le biais de traitement lumineux de plusieurs heures. De tels temps d'application sont cependant difficilement compatibles avec la plupart des applications qui pourraient être envisagées pour la lumière visible. Une solution pour réduire ce temps pourrait être d'augmenter la puissance lumineuse.

Nos travaux sur la lumière visible ont tout d'abord visé à comprendre l'effet de la lumière UHI sur les micro-organismes. Pour cela, nous avons appliqué un stress lumineux sur un micro-organisme modèle, la levure *S. cerevisiae*, par le biais du laser d'un microscope. Ceci a permis de réaliser des traitements ciblés à une longueur d'onde de 405 nm et d'observer directement et au cours du temps les effets du traitement. Ces effets ont pu être caractérisés par l'utilisation de sondes fluorescentes, le Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) et l'AminoPhenyl Fluorescein (APF), qui fluorescent en présence d'oxygène singulet (Figure 31). La membrane plasmique des levures est imperméable à la sonde SOSG. Lors de l'application d'un traitement lumineux UHI à 405 nm, les premières images montrent un marquage du pourtour des cellules indiquant la production d'oxygène singulet. Ce marquage devient de plus en plus intense au cours du temps jusqu'à ce qu'un marquage intracellulaire apparaisse brutalement. Cette observation indique que la membrane plasmique des levures se perméabilise et permet alors à la sonde d'envahir l'espace intracellulaire. Une éjection de matériel cellulaire est également observée.

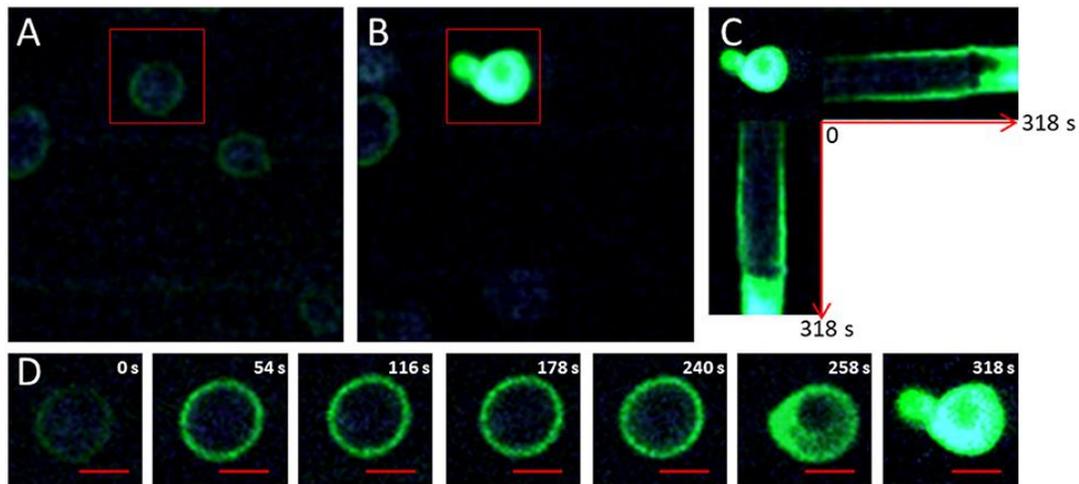


Figure 31. Visualisation de la production d'oxygène singulet à l'aide de la sonde SOSG lors du traitement de levures *S. cerevisiae* à une longueur d'onde équivalente de 415 nm. (A) Image au début du traitement lumineux. Le rectangle rouge indique la levure ciblée par le traitement. (B) Image à la fin du traitement lumineux réalisée à 318s. (C) Coupes horizontales et verticales de l'évolution temporelle de la fluorescence dans les cellules ciblées pendant le traitement de photo-oxydation. (D) Évolution au cours du temps du marquage fluorescent de la levure ciblée. La barre d'échelle rouge représente 2  $\mu\text{m}$  (Grangeteau et al. 2018).

La membrane plasmique des levures étant imperméable à la sonde SOSG, cette première expérimentation ne permet pas de savoir si de l'oxygène singulet est produit au niveau intracellulaire. La même manipulation a alors été réalisée avec la sonde APF qui passe au travers de la membrane plasmique (Figure 32). Le marquage observé au cours du traitement révèle une fluorescence initiale sur le pourtour cellulaire qui diffuse ensuite dans l'espace intracellulaire. L'ensemble du cytoplasme semble marqué à l'exception de la vacuole jusqu'à ce qu'interviennent la rupture de la membrane plasmique. Deux causes peuvent expliquer la disparition de la vacuole : la contraction de la levure lors sa perméabilisation conduisant à une défocalisation de la cellule ou une rupture de la membrane vacuolaire.

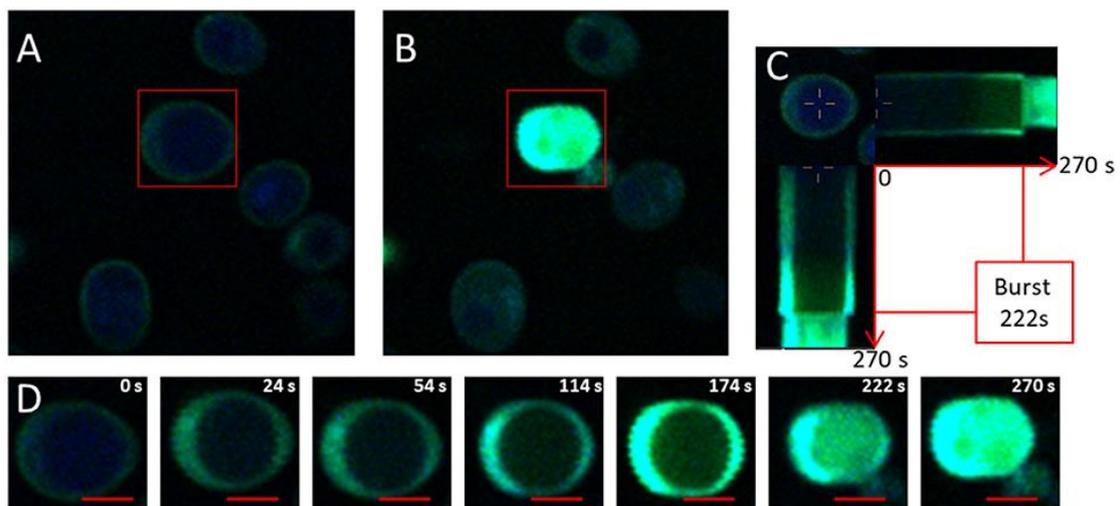


Figure 32. Visualisation de la production d'oxygène singulet à l'aide de la sonde APF lors du traitement de levures *S. cerevisiae* à une longueur d'onde équivalente de 415 nm. (A) Image au début du traitement lumineux. Le rectangle rouge indique la levure ciblée par le traitement. (B) Image à la fin du traitement lumineux réalisée à 270s. (C) Coupes horizontales et verticales de l'évolution temporelle de la fluorescence dans les cellules ciblées pendant le traitement de photo-oxydation. (D) Évolution au cours du temps du marquage fluorescent de la levure ciblée. La barre d'échelle rouge représente 2  $\mu\text{m}$  (Grangeteau et al. 2018).

Les résultats obtenus montrent que la membrane plasmique est une cible des traitements lumineux visibles UHI mais aussi qu'elle semble être à l'origine de la genèse de l'oxygène singulet. Pour confirmer cette hypothèse, une dernière expérience a consisté à cibler spécifiquement avec le laser deux zones différentes des levures : l'enveloppe cellulaire (membrane plasmique et paroi) ou une zone dans l'espace intracellulaire (Figure 33).

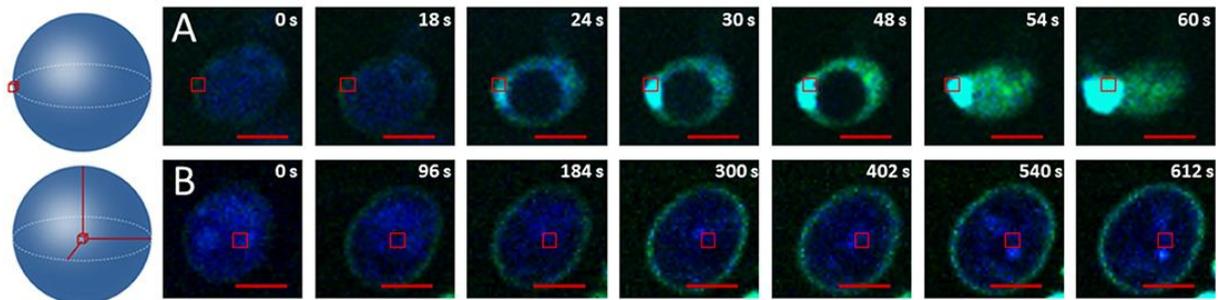


Figure 33. Visualisation de la production d'oxygène singulet à l'aide de la sonde APF lors du traitement de levures *S. cerevisiae* à une longueur d'onde équivalente de 415 nm. (A) La zone de traitement, indiquée par le rectangle rouge, est située sur la membrane plasmique. (B) La zone de traitement, indiquée par le rectangle rouge, est située dans l'espace intracellulaire (Grangeteau et al. 2018).

La focalisation du laser sur l'enveloppe cellulaire induit une augmentation de la fluorescence autour de la zone d'excitation (Figure 33A). La fluorescence s'intensifie au cours du temps et la membrane plasmique se rompt rapidement (à 54 s dans l'exemple présenté) à l'endroit de la zone d'excitation. Dans le cas de l'excitation au niveau intracellulaire, aucune fluorescence n'apparaît au cours du temps au niveau de la zone d'excitation (Figure 33B). La seule fluorescence visible correspond au pourtour de la cellule qui devient de plus en plus fluorescent au cours du temps. Cette fluorescence est liée à la production d'oxygène singulet causée par l'utilisation du laser pour réaliser les images au cours du temps. Cette dernière expérience suggère que la photo-oxydation induite par un traitement à la lumière visible UHI se produit au niveau de la membrane plasmique. La production d'oxygène singulet au niveau membranaire peut s'expliquer par la présence de porphyrines au niveau de la membrane plasmique des levures (Fraikin et al. 1996). L'oxygène singulet a une durée de vie dans l'eau de 3,5  $\mu$ s. En combinant cette durée de vie avec sa vitesse de diffusion, la distance maximale à laquelle l'oxygène singulet peut agir à partir de sa zone de production est d'environ 200 nm (Baier et al. 2005). Ceci permet d'expliquer pourquoi la membrane plasmique est une cible majeure des traitements à la lumière visible.

**Les travaux rapportant la possibilité d'utiliser la lumière visible pour inactiver des micro-organismes sont nombreux. Cependant, la plupart de ces travaux ont été réalisés avec des puissances lumineuses faibles nécessitant des traitements de plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures. Les mécanismes cellulaires conduisant à la mort des cellules ne sont également pas totalement élucidés. Dans le cas de traitement à la lumière bleue UHI, nos travaux ont permis de montrer que la membrane plasmique est une structure clé dans le mécanisme de**

**photo-oxydation : elle est le site de production de l'oxygène singulet et est la cible de cette espèce réactive. Il a également été observé que des traitements de quelques minutes sont suffisants pour perméabiliser la membrane plasmique de levures dans le cas de traitement UHI. Ces premiers résultats permettaient d'envisager la lumière bleue UHI comme un procédé d'inactivation microbienne qui pourrait notamment être utilisé dans le domaine agro-alimentaire.**

**Publication liée aux travaux présentés dans cette partie :**

- Grangeteau, C., Lepinois, F., Winckler, P., Perrier-Cornet, J.-M., **Dupont, S.**, & Beney, L. (2018). Cell Death Mechanisms Induced by Photo-Oxidation Studied at the Cell Scale in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, 9.

### *3.3.3.2. Développement d'un réacteur LED à ultra haute intensité*

Afin d'envisager une utilisation à grande échelle de la lumière bleue UHI comme procédé d'inactivation microbienne, il est nécessaire de développer des dispositifs de traitement permettant d'appliquer sur des échantillons la lumière à haute puissance dans une gamme de longueurs d'onde ciblées. La technologie laser permet de cibler des longueurs d'onde précises mais la surface qui pourrait être traitée par cette technologie serait très limitée. Les diodes électroluminescentes, appelées communément LED (Light Emitting Diode), présentent beaucoup d'avantages pour développer un dispositif basé sur l'application de lumière bleue : possibilité de cibler une plage de longueurs d'onde, durée de vie très importante, taille très réduite, pas d'émission de rayonnements ultra-violet et infrarouge. De plus, les technologies associées aux LED sont en constants progrès. Selon la loi de Haitz, le coût d'un lumen est divisé par 10 tandis que l'intensité d'une LED est multipliée par 20 tous les 10 ans (Steele 2007). Ces avantages nous ont conduit à choisir des LED pour développer un réacteur lumineux UHI.

Pour fabriquer ce réacteur, nous nous sommes tournés vers la société NLX (Next Lighting eXperience) basée à Blois. Cette société développe des solutions de lumières innovantes à destination de professionnels. Sur la base d'un cahier des charges que nous leur avons fourni, le premier réacteur LED de notre laboratoire a pu être construit (Figure 34A). Ce réacteur est constitué de 200 LED placées sur un support relié à un dissipateur thermique pour limiter l'échauffement des LED (Figure 34B). Les optiques associées aux LED ont été choisies afin d'obtenir un traitement homogène d'un échantillon placé à 20 cm des LED (Figure 34C). À cette distance, la puissance théorique surfacique maximale qui peut être fournie par le réacteur est d'environ 9000 W/m<sup>2</sup>. Les LED utilisées pour la fabrication du réacteur sont des LED 405 nm dont le spectre s'étale entre 380 et 430 nm avec un pic d'émission de lumière à 405 nm (Figure 34D).

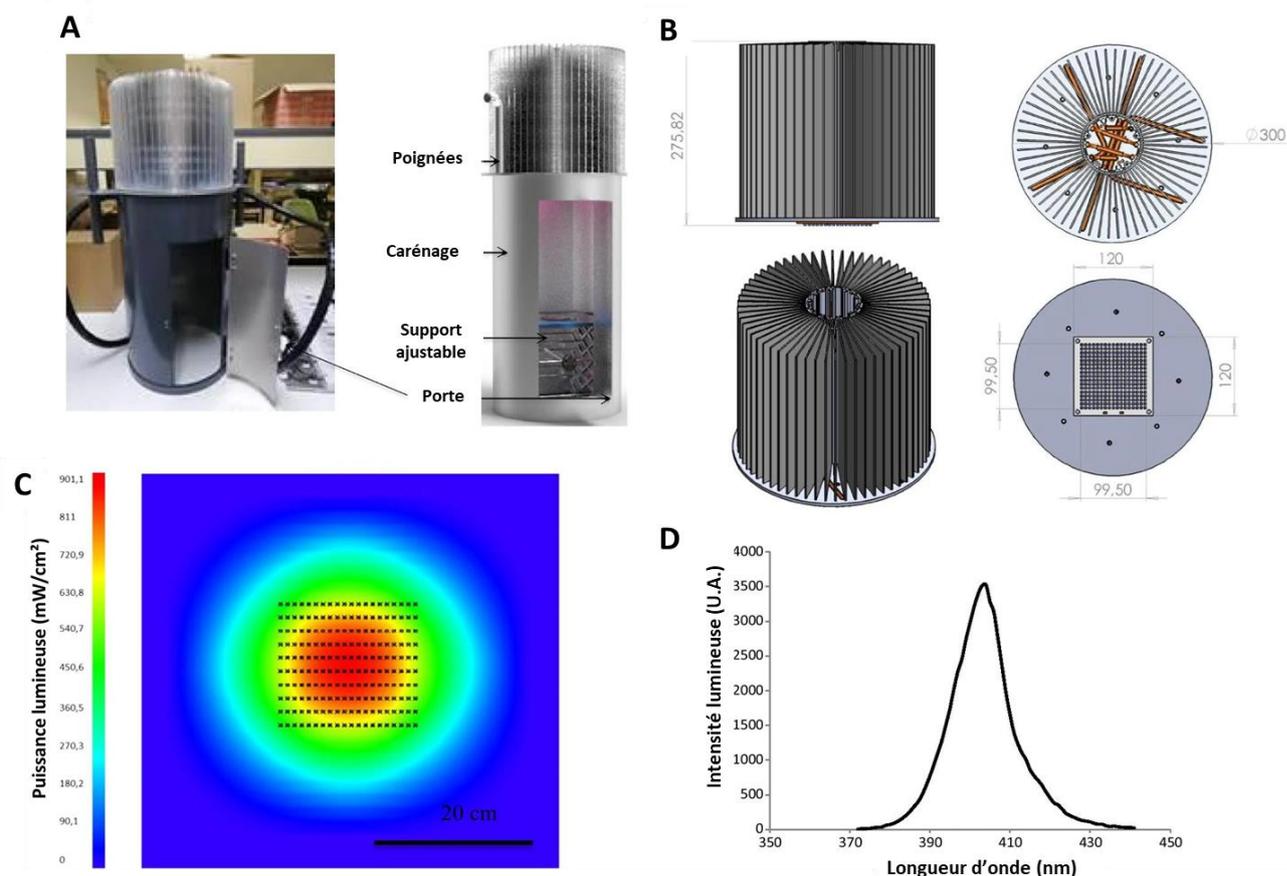


Figure 34. Présentation du réacteur lumineux à base de LED développé dans le laboratoire. (A) Vue et représentation du réacteur avec une version schématique de l'intérieur du dispositif. (B) Schéma du support des LED et du dissipateur thermique en aluminium du réacteur. (C) Modélisation de l'irradiation reçue par des échantillons placés à 20 cm de la source LED. La puissance maximale estimée (901 mW/cm<sup>2</sup>) est représentée en rouge. (D) Spectre d'intensité des LED 405 nm utilisées dans le réacteur (Lang et al. 2022).

L'efficacité de ce réacteur sur l'inactivation microbienne a été testée par la réalisation de traitement sur un micro-organisme modèle, la levure *S. cerevisiae* (Figure 35). Les premières expériences ont consisté à rechercher s'il existait un seuil minimal d'énergie à appliquer pour inactiver les levures et à étudier si la puissance appliquée avait un impact sur les taux d'inactivation. Pour cela, deux niveaux d'énergie ont été étudiés (164 et 405 J/cm<sup>2</sup>) obtenus avec l'application de différentes puissances (112 mW/cm<sup>2</sup>, 225 mW/cm<sup>2</sup>, 450 mW/cm<sup>2</sup>, 901 mW/cm<sup>2</sup>) (Figure 35A et B). Pour obtenir la même énergie avec les différents niveaux de puissance, le temps d'application du traitement est ajusté. À titre d'exemple, le temps d'application est divisé par 2 lorsque la puissance est multipliée par 2. Le traitement à 164 J/cm<sup>2</sup> n'a conduit à aucune inactivation des levures et ce quelle que soit la puissance appliquée (Figure 35A). L'augmentation de l'énergie reçue par les échantillons à 405 J/cm<sup>2</sup> a permis d'inactiver les levures. Cette inactivation dépend cependant de la puissance appliquée : l'inactivation atteint plus de 4 log pour la puissance de 901 mW/cm<sup>2</sup> alors qu'elle est d'environ 0,5 log pour 112 mW/cm<sup>2</sup>. Ces résultats montrent qu'il existe un seuil d'énergie minimal à dépasser pour induire l'inactivation des levures. Ils montrent également que les puissances fortes sont plus létales que les puissances faibles dans le cas où le seuil d'énergie minimal est dépassé.

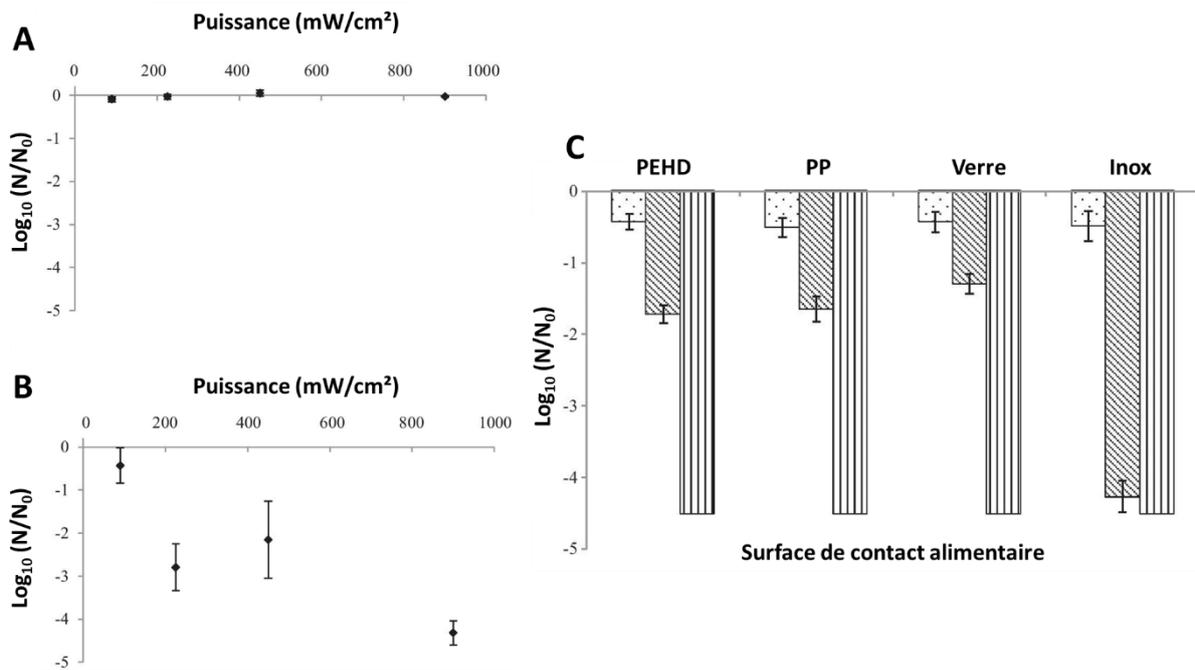


Figure 35. Inactivation de levures *S. cerevisiae* par un traitement lumineux UHI à 405 nm. (A) Effet de la puissance lumineuse sur l'inactivation de levures exposées en milieu liquide à une dose de 164 J/cm<sup>2</sup>. (B) Effet de la puissance lumineuse sur l'inactivation de levures exposées en milieu liquide à une dose de 405 J/cm<sup>2</sup>. (C) Inactivation de levures déposées sur différentes surfaces technologiques rencontrées dans le domaine agroalimentaire par un traitement à 901 mW/cm<sup>2</sup>. Temps de traitement : 1min, 2 min et 5 min (Lang et al. 2022).

Des essais d'inactivation de levures déposées à la surface de différents matériaux représentatifs de surfaces technologiques rencontrées dans les industries agroalimentaires ont également été réalisés (Figure 35C). Les traitements ont consisté à appliquer la lumière bleue UHI pendant 1, 2 ou 5 min. Pour l'ensemble des surfaces, les traitements de 1 min sont peu efficaces avec une diminution de la population inférieure à 0,5 log. L'allongement de la durée du traitement permet d'augmenter l'inactivation des levures. L'inactivation est similaire pour le polyéthylène haute densité (PEHD), le polypropylène (PP) et le verre avec des inactivations de 1,5 log et 4,5 pour les traitements de 2 et 5 min, respectivement. L'inox se démarque des autres matériaux avec une inactivation supérieure à 4 log dès 2 min de traitement. Cette différence pourrait être en lien à un effet thermique qui dépendrait de la nature du matériau. Nous avons donc mesuré la température des différents matériaux lors des traitements lumineux. Les résultats obtenus (non présentés) ont révélé une augmentation de température similaire pour l'ensemble des matériaux avec une température d'environ 35 °C après 5 min de traitement. Cette température n'est pas létale pour les levures indiquant que l'inactivation n'est pas liée à l'échauffement des matériaux et que l'inactivation supérieure observée sur l'inox n'est pas liée à un effet thermique. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'efficacité plus importante sur l'inox est un indice de réflexion plus élevé de ce matériau en comparaison aux autres permettant à plus d'énergie lumineuse d'atteindre les levures.

L'utilisation de la lumière visible UHI comme procédé d'inactivation microbienne requiert le développement de dispositifs permettant d'appliquer la lumière dont les caractéristiques en termes de longueurs d'onde et de puissance peuvent être contrôlées. Le développement d'un réacteur UHI à base de LED nous a permis d'appliquer des traitements intenses sur un micro-organisme modèle. Il a pu être montré que des traitements de quelques minutes peuvent être suffisants pour inactiver la levure *S. cerevisiae*. Il a également été montré que l'augmentation de la puissance lumineuse permet de diminuer l'énergie requise pour inactiver les levures. Cet effet est d'autant plus intéressant pour réduire les temps de traitement et envisager des applications potentielles de ce procédé.

**Publication et brevet liés au thème des travaux présentés dans cette partie :**

- Lang, E., Thery, T., Peltier, C., Colliau, F., Adamuz, J., Grangeteau, C., **Dupont, S.**, & Beney, L. (2022). Ultra-high irradiance (UHI) blue light: Highlighting the potential of a novel LED-based device for short antifungal treatments of food contact surfaces. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 106(1), 415-424.

- Beney, L., Cayot, P., Grangeteau, C., **Dupont., S.** (2021) Brevet d'invention (FR3084262B1): Procédé d'élimination de microorganismes présents dans et/ou à la surface d'un matériau à décontaminer. (Brevet étendu à l'international (EP3829654A1 et WO2020020591A1)).

### 3.3.3.3. Inactivation de micro-organismes d'altération ou pathogènes des aliments par la lumière à ultra haute intensité

En réponse à des conditions stressantes de leur environnement comme l'épuisement nutritif du milieu, certains micro-organismes ont la capacité de former des spores. Les spores sont des formes dormantes de micro-organismes présentant un métabolisme ralenti et sont caractérisées par des modifications de leur structure par rapport à l'état végétatif. Ces changements sont notamment le développement de membranes externes, la modification de la paroi cellulaire et des modifications génétiques (Rozali et al. 2017; Cho and Chung 2020). Ces modifications entraînent une augmentation de la résistance des micro-organismes aux perturbations de leur environnement. Les spores de bactéries et de champignons sont à l'origine de contaminations dans l'industrie alimentaire pouvant conduire à des risques pour la santé des consommateurs. C'est par exemple le cas pour les spores bactériennes de *Bacillus cereus* ou pour les spores fongiques du genre *Penicillium*.

Afin de pouvoir être utilisé comme procédé de décontamination dans l'industrie alimentaire, la lumière visible UHI se doit de présenter une efficacité réelle sur les micro-organismes sporulés. Nous avons donc mené une étude portant sur l'effet de la lumière bleue UHI sur des spores de bactéries (*B. cereus*), de levures (*S. cerevisiae*) et de champignons filamenteux (*P. digitatum*). L'hypothèse de travail est que les fortes puissances lumineuses pourraient permettre d'inactiver ces formes de résistance. En plus de la longueur d'onde 405 nm que nous avons déjà étudiée,

l'efficacité de la longueur d'onde 385 nm a également été utilisée. Cette longueur du spectre visible est à la limite avec les rayonnements UV-A. Quelques études ont montré que cette longueur pouvait être plus efficace dans l'inactivation de micro-organismes sous forme végétatives que la longueur d'onde 405 nm (Vollmerhausen et al. 2017; Lee et al. 2022). Les résultats obtenus sur des spores de *S. cerevisiae* et *B. cereus* révèlent que des temps d'application plus longs, en comparaison de ceux obtenus sur les formes végétatives de levures, doivent être appliqués pour observer une inactivation (Figure 36). Dans le cas de la longueur d'onde à 405 nm, les traitements de 30 min ont conduit à une inactivation d'environ 1 log pour les deux types de micro-organismes. La longueur d'onde 385 nm s'est révélée plus efficace avec une destruction d'environ 4 log indiquant que la longueur d'onde 385 nm est également plus efficace que la longueur d'onde 405 nm sur les formes sporulées.

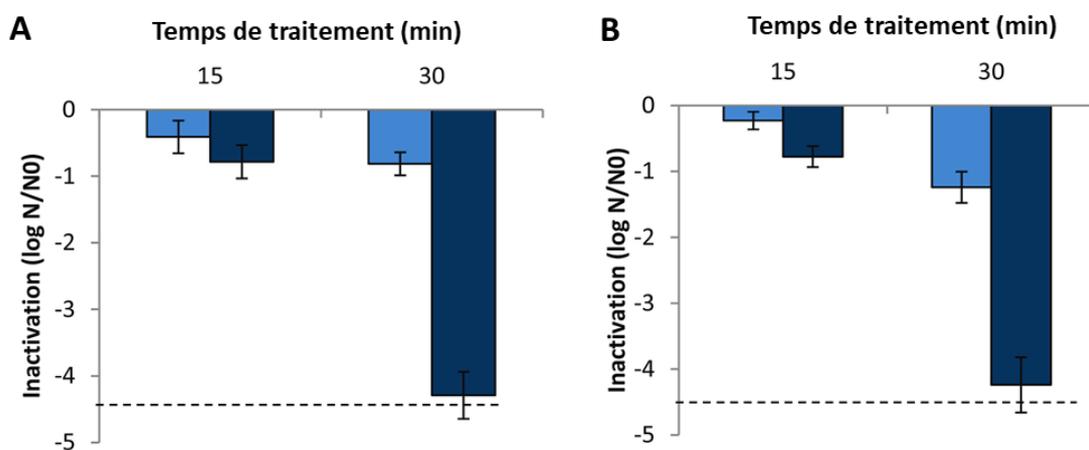


Figure 36. Inactivation de spores de micro-organismes par un traitement à la lumière bleue avec une puissance reçue par l'échantillon de 250 mW/cm<sup>2</sup>. (A) Spores de *S. cerevisiae*. (B) Spores de *B. cereus*. Les traitements réalisés à 405 nm sont présentés en bleu clair et ceux réalisés à 385 nm sont présentés en bleu foncé (Thery et al. 2023).

L'efficacité d'un traitement UHI a ensuite été testé sur des spores de champignons filamenteux de l'espèce *Penicillium digitatum*. Ce champignon est un contaminant fréquent des agrumes conduisant à leur pourrissement et à de grosses pertes post-récolte. Dans un premier temps, les spores ont été traitées en suspension dans de l'eau distillée pendant 5, 10 ou 15 min (Figure 37A). Les traitements de 5 min à 385 ou 405 nm ont montré une faible efficacité avec des inactivations inférieures à 0,5 log. En revanche, l'application de traitements de 10 et 15 min ont conduit respectivement à des taux d'inactivation d'environ 2,5 log et 4 log indépendamment de la longueur d'onde appliquée. Afin d'évaluer si un traitement à la lumière UHI peut être efficace s'il est appliqué sur des fruits, une seconde expérience a visé à traiter des mandarines contaminées par des spores de *P. digitatum*. Le pourrissement des fruits a été estimée en évaluant la croissance radiale du champignon après inoculation des spores. En pratique, le diamètre des zones de pourriture molle, de sporulation et mycélienne a été mesuré (Figure 37B). Deux traitements lumineux à 385 nm apportant la même énergie ont été appliqués : 125 mW/cm<sup>2</sup> pendant 20 min ou 250 mW/cm<sup>2</sup> pendant 10 min (Figure 37C). Les résultats obtenus montrent que l'application des traitements lumineux UHI permettent de réduire significativement le développement du

champignon. Cet effet est d'autant plus marqué pour le traitement appliqué avec la plus forte puissance confirmant l'intérêt d'utiliser des puissances élevées. Le traitement des fruits impose cependant de limiter la puissance à une valeur qui n'endommage pas le fruit. En effet, l'application de fortes puissances lumineuses conduit à une élévation de la température de surface de fruit pouvant ainsi l'endommager. Cette limitation n'existe pas pour le traitement de surfaces technologiques contaminées.

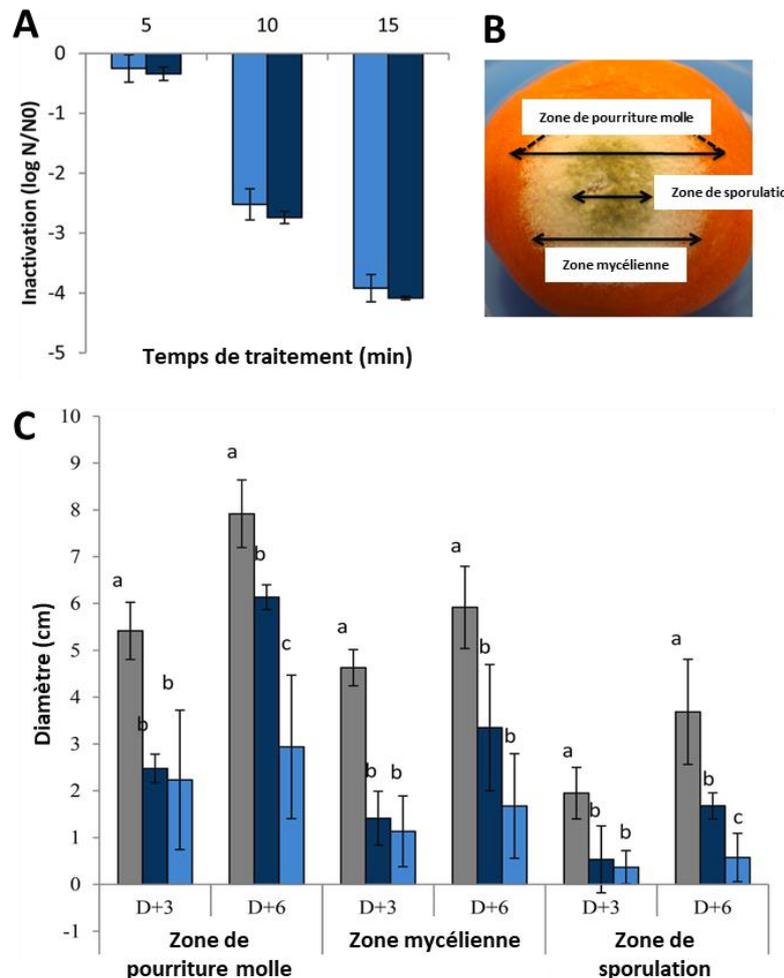


Figure 37. Inactivation de spores de *P. digitatum* pour un traitement à la lumière bleue UHI. (A) Inactivation de spores en suspension dans de l'eau distillée. Les histogrammes présentés en bleu clair correspondent à un traitement à 405 nm et ceux en bleu foncé à un traitement à 385 nm. (B) illustration des différentes zones de pourrissement d'une mandarine après contamination par *P. digitatum*. (C) Évolution du diamètre des différentes zones de pourrissement au troisième jour (D+3) et au sixième jour (D+6) après inoculation. Les histogrammes en gris représentent les mandarines qui n'ont pas été traitées avec la lumière bleue UHI (contrôle), ceux en bleu foncé les mandarines traitées à 385 nm pendant 20 min avec une puissance de 125 mW/cm<sup>2</sup> et ceux en bleu clair les mandarines traitées à 385 nm pendant 10 min avec une puissance de 250 mW/cm<sup>2</sup>. Les deux traitements lumineux apportaient la même énergie aux mandarines (Thery et al. 2023).

De par leur résistance à de nombreux stress physiques et chimiques, les spores de micro-organismes sont les formes microbiennes les plus difficiles à inactiver. Ces spores peuvent cependant être à l'origine de l'altération des aliments ainsi que de pathologies pour les consommateurs. Les procédés de décontamination microbienne doivent donc viser leur

**inactivation. Nos travaux ont montré un effet sporicide des traitements à la lumière bleue UHI. Les temps d'application requis sont cependant plus longs que pour inactiver les formes végétatives et sont de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes. Ces durées de traitement ainsi que l'échauffement généré par l'illumination pourraient être un frein au développement d'un procédé de décontamination par l'utilisation de la lumière bleue UHI. Une voie d'optimisation possible serait d'appliquer la lumière par le biais de flashes lumineux plutôt que d'appliquer un traitement continu. Ceci pourrait permettre d'appliquer des puissances instantanées plus fortes que les puissances que nous avons appliquées en continu et pourrait également permettre de limiter l'échauffement de matrices sensibles thermiquement.**

**Publication liée aux travaux présentés dans cette partie :**

- Thery, T., Grangeteau, C., Beney, L., **Dupont, S.** (2023). Sporicidal efficiency of an ultra-high irradiance (UHI) near UV/visible light treatment: an example of application to infected mandarins. *FOOD CONTROL*.

### 3.4. Perspectives des travaux de recherche

Depuis le début de mes activités de recherche, la démarche scientifique que je mets en œuvre vise à comprendre le métabolisme et la réponse à des perturbations environnementales de micro-organismes pour développer des procédés de maîtrise de leur viabilité. Dans le cas de perturbations drastiques telles que celles associées aux procédés technologiques, les réponses étudiées comprennent des réponses biologiques mais surtout des réponses structurales qu'il est nécessaire de caractériser pour comprendre finement les effets des perturbations. Le but est d'identifier les talons d'Achille ou, à l'inverse, les mécanismes de résistance des micro-organismes à des perturbations. Cette connaissance est ensuite utilisée pour développer et optimiser des procédés de préservation ou de décontamination microbienne. Mes futurs travaux poursuivront cette démarche pour approfondir et développer de nouvelles connaissances sur les thèmes sur lesquels j'ai développé une expertise. Les principaux thèmes de recherche envisagés pour mes futurs travaux sont présentés dans les paragraphes suivants.

#### Rôle de la paroi cellulaire dans la résistance des levures à la déshydratation :

Jusqu'à maintenant, une partie importante de mes travaux ont visé à caractériser la réponse de la membrane plasmique de la levure *S. cerevisiae* pour comprendre les mécanismes cellulaires conduisant à la mort ou la survie des cellules lors de perturbations hydriques. Dans le cas des levures, la membrane plasmique est en étroite interaction avec la paroi cellulaire. La paroi cellulaire représente entre 15 et 30% de la matière sèche des levures et est composée principalement de sucres (1,3- $\beta$ -glucanes et 1,6- $\beta$ -glucanes) pour sa couche interne et de mannoprotéines pour sa couche externe. Bien que longtemps décrite comme une structure passive limitant le passage de certains solutés, la paroi cellulaire est maintenant considérée comme une structure dynamique dont la synthèse implique de nombreux gènes (environ 1200) et est soumise à une régulation complexe (de Groot et al. 2001). Son rôle dans la résistance des levures à des perturbations de l'environnement a fait l'objet de nombreuses études. Il a ainsi été montré que la paroi subissait des modifications de structure et jouait un rôle lors de perturbations thermiques (Verna et al. 1997), acides (Ribeiro et al. 2021), hypo-osmotiques (Valdivia and Schekman 2003) ou bien encore hyperosmotiques (Jin et al. 2022). Ces études ont cependant focalisé sur des perturbations modérées pour lesquelles la croissance des levures en conditions stressantes était évaluée. À ma connaissance, il existe très peu d'études qui ont cherché à caractériser l'évolution de la paroi de levures lors d'une déshydratation poussée qui permettrait d'atteindre les conditions de stabilisation. Cette connaissance pourrait cependant se révéler très intéressante pour comprendre comment certaines levures peuvent résister aux procédés de stabilisation par séchage.

Une partie de mes travaux futurs viseront à caractériser l'évolution structurale de la paroi de *S. cerevisiae* lors de déshydratations poussées par séchage. Le séchage aboutit à des échantillons solidifiés limitant l'utilisation de certaines analyses qui ne peuvent que se réaliser en milieu hydraté. Le plateau PIMS hébergé par l'UMR PAM vient de faire l'acquisition d'un microscope

mIRage permettant de faire de la microscopie infrarouge et Raman. L'avantage de cette technologie est de pouvoir être utilisable à la fois sur des échantillons hydratés et secs. Cela permettra ainsi d'analyser l'évolution de la structure moléculaire de la paroi au cours d'un processus de séchage. La microscopie de force atomique (AFM) pourrait également être utilisée pour caractériser l'évolution de l'élasticité de la paroi lors de la déshydratation. Les résultats attendus pourraient permettre de comprendre comment la structure et les propriétés de la paroi évoluent lors de la contraction volumique associée à la déshydratation cellulaire. Pour approfondir la compréhension du rôle de la paroi, sa composition pourra également être modulée pour l'utilisation de mutants ou en jouant sur la composition du milieu de culture (Aguilar Uscanga and Francois 2003; Jin et al. 2022). Le financement de ces travaux de recherche pourrait s'appuyer sur une demande de bourse de thèse à l'école doctorale Environnements-Santé de l'Université de Bourgogne Franche-Comté.

#### Rôle des protéines dans la vitrification de la levure lors du séchage

Une partie des résultats présentés dans ce manuscrit ont montré que les protéines jouaient avec le tréhalose un rôle pour obtenir un état vitrifié des levures lors d'un procédé de séchage. Le mécanisme ainsi que la nature spécifique (s'il y a besoin d'une spécificité) des protéines ne sont cependant pas connus. Les premières études concernant le rôle des protéines dans le processus d'anhydrobiose ont été initiées il y a un peu plus de 30 ans. Ces travaux portaient principalement sur des graines et ont mis en avant les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) qui sont synthétisées par de nombreux organismes anhydrobiotes. Depuis, d'autres protéines jouant un rôle dans l'anhydrobiose ont été décrites comme par exemple les protéines CAHS (Cytoplasmic Abundant Heat Soluble) présentes uniquement chez les tardigrades (Boothby et al. 2017). Les protéines LEA et CAHS ont la particularité d'être des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP : intrinsically disordered proteins) qui ne possèdent pas une conformation tridimensionnelle stable mais existent sous différentes conformations interchangeable. Cette spécificité repose sur l'absence de grandes régions hydrophobes au sein des protéines et la présence d'un grand nombre de résidus polaires et chargés faisant des interactions avec l'eau. Les hydrophilines présentes chez la levure, notamment la protéine Hsp12, appartiennent également à ces IDP (Kim et al. 2018). Le rôle des IDP dans l'anhydrobiose fait l'objet de nombreuses recherches actuellement mais les mécanismes qui pourraient expliquer leur fonction lors d'un stress hydrique sont encore largement inconnus (Boothby and Pielak 2017). Les principaux mécanismes proposés et actuellement étudiés sont la stabilisation des membranes lipidiques, l'inhibition de l'agrégation des protéines ou le piégeage des espèces réactives de l'oxygène.

De par leur flexibilité conformationnelle, les IDP pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de la cristallisation du cytoplasme lors du séchage jusqu'à des niveaux permettant la conservation à long terme des levures. L'étude du rôle de la protéine Hsp12 dans la conservation de levures à l'état déshydraté pourrait permettre de tester cette hypothèse. Pour cela, un mutant délété pour

le gène Hsp12 pourra être utilisé. Son taux de survie à l'état déshydraté et au cours du temps pourra être comparé à la souche sauvage. La caractérisation de l'état vitreux ou cristallisé sera également réalisée sur les deux souches par calorimétrie différentielle à balayage. L'optimisation de la stabilisation de micro-organismes est un sujet d'intérêt fort pour les producteurs de ferments et de probiotiques. Ces travaux de recherche pourraient ainsi être développés dans le cadre d'une thèse CIFRE avec un des industriels du secteur, tels que Lesaffre ou Lallemand, avec lesquels le laboratoire interagit depuis de nombreuses années.

#### Internalisation de tréhalose par osmoporation pour la conservation à l'état sec

Bien que n'étant pas la seule molécule impliquée dans l'anhydrobiose, le tréhalose est une molécule clé pour permettre la stabilité à l'état sec d'un système vivant. L'accumulation de cette molécule par les levures *S. cerevisiae* est un des mécanismes clé dans leur stabilité à l'état sec. Même si certaines bactéries sont capables de synthétiser du tréhalose lors de conditions stressantes, les quantités accumulées sont moindres et les bactéries sont généralement beaucoup plus fragiles à l'état sec. Pour jouer son rôle dans la stabilisation de cellules à l'état sec, le tréhalose doit être présent dans le cytoplasme des cellules. La membrane plasmique n'étant pas perméable au tréhalose, l'internalisation de tréhalose requiert de perméabiliser transitoirement les cellules afin de permettre l'entrée de la molécule (Crowe et al. 2001). Depuis une dizaine d'années, nous travaillons en collaboration avec une équipe brésilienne (Dr Marcia Regina da Silva Pedrini, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brésil) sur le développement d'un procédé de perméabilisation transitoire de la membrane plasmique de micro-organismes pour internaliser des composés d'intérêt. Ce procédé consiste à réaliser une perturbation hyperosmotique non létale qui induit une diminution du volume cellulaire puis à réhydrater brutalement les micro-organismes avec une solution contenant la molécule à internaliser. Le flux entrant se produisant lors de la réhydratation perméabilise transitoirement la membrane plasmique et favorise l'entrée de la molécule d'intérêt dans le cytoplasme. Ce procédé d'osmoporation est applicable à des levures (Pedrini et al. 2014; Pedrini et al. 2014; Camara et al. 2016; Medeiros et al. 2018; de Medeiros et al. 2019) mais aussi à des bactéries (de Andrade et al. 2022a; de Andrade et al. 2022b).

Le tréhalose présente un effet osmotique faible : l'activité de l'eau d'une solution de tréhalose à 700 g/L est d'environ 0,96. Sur cette base, il semble envisageable d'utiliser une solution de tréhalose comme solution de réhydratation dans le procédé d'osmoporation. Cela pourrait permettre d'introduire au niveau intracellulaire du tréhalose dans des micro-organismes qui pourraient ensuite être stabilisés par séchage. Bien que le procédé soit efficace du point de vue de l'internalisation de molécules, nous n'avons pas encore totalement caractérisé les mécanismes liés aux transferts de masse lors de la réhydratation. Il est donc envisagé de quantifier les variations de volume cellulaire lors des différentes phases du procédé d'osmoporation et de quantifier finement la quantité de tréhalose internalisé. Ces données pourraient permettre de mieux comprendre le phénomène et de modéliser les transferts de matière. Les travaux sur

l'osmoporation sont nés d'une collaboration avec Marcia Regina da Silva Pedrini et je souhaite ainsi que ces prochains travaux s'intègrent dans la poursuite de cette collaboration avec la réalisation d'une thèse en co-tutelle. Un projet pourra également être déposé dans le cadre du programme CAPES-COFECUB de Campus France afin de financer les frais de voyage et de séjour des chercheurs associés au projet ainsi qu'une bourse doctorale pour le(la) doctorant(e) recruté(é).

### Effet de la lumière à ultra haute intensité (UHI) sur les micro-organismes

Même si l'effet de la lumière visible sur les micro-organismes a déjà fait l'objet de nombreuses études, les connaissances sur l'effet de l'application de lumière UHI restent pour le moment encore limitées. Cette limitation est liée à la nécessité de devoir développer des sources d'illumination permettant d'appliquer les traitements UHI. Dans les travaux que nous avons réalisés, nous avons développé un premier réacteur d'éclairage à base de LED qui permet d'atteindre une puissance mesurée au niveau d'un échantillon d'environ 5000 W/m<sup>2</sup> sur les longueurs d'onde 385 nm et 405 nm. Ce premier réacteur nous a permis de tester l'effet létal de la lumière UHI sur différents micro-organismes. Nos résultats ont montré que (i) la lumière UHI pouvait détruire des micro-organismes végétatifs ou sporulés par des traitements avec des durées allant jusqu'à une dizaine de minutes, (ii) l'énergie requise pour tuer les micro-organismes diminue lorsque la puissance est augmentée, (iii) les traitements UHI peuvent conduire à un échauffement qui pourrait altérer des matrices alimentaires sensibles.

Différentes pistes d'optimisation sont envisagées :

- Application de la lumière UHI en mode pulsée qui permettrait d'augmenter la puissance lors des pulses d'illumination tout en limitant l'échauffement par dissipation de la chaleur lors des phases non-éclairées. Nous avons d'ores et déjà développé un réacteur LED pulsé qui vient d'arriver dans notre laboratoire. Ce réacteur peut développer une puissance en crête de 15 000 W/m<sup>2</sup> sur les pulses d'illumination à 385 nm. Le rapport cyclique (duty cycle) des cycles d'éclairage sont paramétrables permettant de contrôler la puissance moyenne appliquée.
- Utilisation de molécules exogènes naturels bactéricides ou fongicides en combinaison avec un traitement lumineux UHI. Par exemple, l'utilisation d'acide férulique ou d'acide caféique, composés végétaux utilisés comme additifs alimentaires, en combinaison avec un éclairage à 385 nm permettent de réduire fortement les temps de traitement. Il a été montré que des traitements basse puissance (80 W/m<sup>2</sup>) de quelques minutes en présence d'acide férulique permettaient d'obtenir les mêmes performances de décontamination sur *Escherichia coli* que des traitements de plus d'une heure (Shirai et al. 2017). Le mécanisme cellulaire relatif à l'effet synergique de la lumière et de l'acide férulique n'a cependant pas été déterminé. Sur la base de la quantité d'énergie nécessaire à apporter

par le traitement lumineux, l'application de lumière UHI avec ce type de molécule pourrait théoriquement permettre d'atteindre des temps de traitements de quelques secondes.

Au-delà de ces possibilités d'optimisation en vue d'applications potentielles, les mécanismes cellulaires conduisant à la mort des cellules lors des traitements à la lumière UHI, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres stratégies, seront recherchés. Cette recherche pourra notamment s'appuyer sur l'utilisation de la microscopie infrarouge ou Raman qui permettra d'évaluer des modifications au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Deux projets de recherche impliquant la lumière UHI sont actuellement en cours. Le premier est le projet inter Carnot Qualiment/Plant2Pro EFFINOX (2022-2024) que je coordonne. Ce projet vise à évaluer le potentiel d'application de la lumière UHI contre des micro-organismes pathogènes ou d'altération des filières viti-vinicoles et céréalières et d'évaluer les effets non-intentionnels sur les matrices traitées. Le second projet est le projet ANR ClostAbat (2022-2025) coordonné par Olivier Firmesse de l'ANSES (Maisons-Alfort) et pour lequel l'UMR PAM est partenaire. Ce projet porte sur la caractérisation des dangers *Clostridium perfringens* et *Clostridioides difficile* dans les filières bovine, porcine et volaille en abattoirs. Dans une des tâches de ce projet, la lumière UHI sera testée pour inactiver ces pathogènes. Au-delà de ces projets en cours, des travaux sur la lumière visible UHI pourront également être effectués dans le cadre d'une collaboration avec la société Pholia, filiale de la société NLX et spécialisée dans le développement de traitements lumineux visant à protéger les plantes, avec laquelle nous avons développé nos premiers réacteurs lumineux. Des discussions sont actuellement en cours avec le responsable de la société pour définir les contours d'un projet de thèse CIFRE.

### 3.5. Références bibliographiques

- Aguilar Uscanga B, Francois J (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37:268–74. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- Baier J, Maier M, Engl R, Landthaler M, Bäuml W (2005) Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *J Phys Chem B* 109:3041–3046. <https://doi.org/10.1021/jp0455531>
- Ball P (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem Rev* 108:74–108
- Beal C, Fonseca F, Corrieu G (2001) Resistance to Freezing and Frozen Storage of *Streptococcus thermophilus* Is Related to Membrane Fatty Acid Composition. *J Dairy Sci* 84:2347–2356. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74683-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74683-8)
- Becze GDe, Liebmann AJ (1944) Aeration in the Production of Compressed Yeast. *Ind Eng Chem* 36:882–890. <https://doi.org/10.1021/ie50418a004>
- Beney L (2010) Rôle de la membrane plasmique dans la survie des microorganismes à la déshydratation : Contribution à l'optimisation de procédés de conservation des cellules biologiques. Université de Bourgogne
- Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Zilberfarb V, Corthier G, Gruss A, Langella P, Issad T (2007) Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl Environ Microbiol* 73:5300–5307. <https://doi.org/10.1128/AEM.00295-07>
- Biener G, Masson-Meyers DS, Bumah VV, Hussey G, Stoneman MR, Enwemeka CS, Raicu V (2017) Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential. *J Photochem Photobiol B* 170:118–124. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.002>
- Bodzen A, Jossier A, Dupont S, Mousset P-Y, Beney L, Lafay S, Gervais P (2021a) Increased Survival of *Lactococcus lactis* Strains Subjected to Freeze-Drying after Cultivation in an Acid Medium: Involvement of Membrane Fluidity. *Food Technol Biotechnol* 59. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.04.21.7076>
- Bodzen A, Jossier A, Dupont S, Mousset P-Y, Beney L, Lafay S, Gervais P (2021b) Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnol* 21:66. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00726-2>
- Boothby TC, Pielak GJ (2017) Intrinsically Disordered Proteins and Desiccation Tolerance: Elucidating Functional and Mechanistic Underpinnings of Anhydrobiosis. *BioEssays* 39:1700119. <https://doi.org/10.1002/bies.201700119>
- Boothby TC, Tapia H, Brozena AH, Piszkiwicz S, Smith AE, Giovannini I, Rebecchi L, Pielak GJ, Koshland D, Goldstein B (2017) Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Mol Cell* 65:975–984.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>

- Bottema CDK, McLean-Bowen CA, Parks LW (1983) Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 734:235–248. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90121-9)
- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Camara A, Dupont S, Beney L, Gervais P, Rosenthal A, Correia R, Pedrini M (2016) Fisetin yeast-based bio-capsules via osmoporation: effects of process variables on the encapsulation efficiency and internalized fisetin content (vol 100, 2016). *Appl Microbiol Biotechnol* 100. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7485-9>
- Chen Y-H, Aull JL, Bell LN (1999) Solid-state tyrosinase stability as affected by water activity and glass transition. *Food Res Int* 32:467–472. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00109-X)
- Cho W-I, Chung M-S (2020) *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Sci Biotechnol* 29:1447–1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701–703. <https://doi.org/10.1126/science.223.4637.701>
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F (2001) The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology* 43:89–105. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2353>
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.003051>
- de Andrade EWW, Dupont S, Beney L, da Silva ES, Hoskin RT, da Silva Pedrini MR (2022a) Techno-functionality of fisetin-enriched yoghurt fermented with *Lactobacillus acidophilus* bio-capsules produced via osmoporation. *Syst Microbiol Biomanufacturing* 2:743–749. <https://doi.org/10.1007/s43393-022-00100-z>
- de Andrade EWW, Dupont S, Beney L, Hoskin RT, da Silva Pedrini MR (2022b) Osmoporation is a versatile technique to encapsulate fisetin using the probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11735-8>
- de Groot PWJ, Ruiz C, Vázquez de Aldana CR, Dueñas E, Cid VJ, Del Rey F, Rodríguez-Peña JM, Pérez P, Andel A, Caubín J, Arroyo J, García JC, Gil C, Molina M, García LJ, Nombela C, Klis FM (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics* 2:124–142. <https://doi.org/10.1002/cfg.85>
- de Medeiros F, Dupont S, Beney L, Roudaut G, Hoskin R, Pedrini M (2019) Efficient stabilisation of curcumin microencapsulated into yeast cells via osmoporation. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:9659–9672. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10196-4>

- de Sarrau B, Clavel T, Zwickel N, Despres J, Dupont S, Beney L, Tourdot-Maréchal R, Nguyen-the C (2013) Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *FOOD Microbiol* 36:113–122. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.008>
- Dupont S, Beney L, Ferreira T, Gervais P (2011) Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim Biophys ACTA-Biomembr* 1808:1520–1528
- Dupont S, Beney L, Gervais P (2013) Conservation à long terme de systèmes biologiques viables et fonctionnels. *Tech Ing* F3480
- 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
- Dupont S, Fleurat-Lessard P, Cruz RG, Lafarge C, Grangeteau C, Yahou F, Gerbeau-Pissot P, Abrahão Júnior O, Gervais P, Simon-Plas F, Cayot P, Beney L (2021) Antioxidant Properties of Ergosterol and Its Role in Yeast Resistance to Oxidation. *ANTIOXIDANTS* 10:1024. <https://doi.org/10.3390/antiox10071024>
- Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *EVOLUTION* 66:2961–2968
- Evans EA, Waugh R, Melnik L (1976) Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys J* 16:585–595. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(76\)85713-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85713-X)
- Fonseca F, Pénicaud C, Tymczynszyn EE, Gómez-Zavaglia A, Passot S (2019) Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:6867–6883
- Fraikin GY, Strakhovskaya MG, Rubin AB (1996) The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *J Photochem Photobiol B* 34:129–135
- Fuller KK, Loros JJ, Dunlap JC (2015) Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Curr Genet* 61:275–288. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0451-0>
- Gallay-Keller M (2021) Conserver et exposer les microbes au tournant du XXe siècle. *Rev D'anthropologie Connaiss* 15. <https://doi.org/10.4000/rac.24154>
- Gélinas P (2019) Active Dry Yeast: Lessons from Patents and Science. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:1227–1255. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12445>
- Gervais P, Marechal PA, Molin P (1992) Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnol Bioeng* 40:1435–1439. <https://doi.org/10.1002/bit.260401119>
- Grangeteau C, Lepinois F, Winckler P, Perrier-Cornet J-M, Dupont S, Beney L (2018) Cell Death Mechanisms Induced by Photo-Oxidation Studied at the Cell Scale in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02640>

- Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26:1–8
- Gwynne PJ, Gallagher MP (2018) Light as a Broad-Spectrum Antimicrobial. *Front Microbiol* 9
- Heinken A, Khan MT, Paglia G, Rodionov DA, Harmsen HJM, Thiele I (2014) Functional Metabolic Map of *Faecalibacterium prausnitzii*, a Beneficial Human Gut Microbe. *J Bacteriol* 196:3289–3302. <https://doi.org/10.1128/JB.01780-14>
- Huang S, Rabah H, Jardin J, Briard-Bion V, Parayre S, Maillard M-B, Le Loir Y, Chen XD, Schuck P, Jeantet R, Jan G (2016) Hyperconcentrated Sweet Whey, a New Culture Medium That Enhances *Propionibacterium freudenreichii* Stress Tolerance. *Appl Environ Microbiol* 82:4641–4651. <https://doi.org/10.1128/AEM.00748-16>
- Jan A, Sood M, Sofi S, Norzom T (2017) Non-thermal processing in food applications: A review. *Int J FOOD Sci Nutr* 2:171–180
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol WJG* 21:8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jin X, Chen M, Coldea TE, Yang H, Zhao H (2022) Protective effects of peptides on the cell wall structure of yeast under osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:7051–7061. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12207-3>
- Kim M-J, Yuk H-G (2017) Antibacterial Mechanism of 405-Nanometer Light-Emitting Diode against *Salmonella* at Refrigeration Temperature. *Appl Environ Microbiol* 83:e02582-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02582-16>
- Kim SX, Çamdere G, Hu X, Koshland D, Tapia H (2018) Synergy between the small intrinsically disordered protein Hsp12 and trehalose sustain viability after severe desiccation. *eLife* 7:e38337. <https://doi.org/10.7554/eLife.38337>
- Lang E, Thery T, Peltier C, Colliau F, Adamuz J, Grangeteau C, Dupont S, Beney L (2022) Ultra-high irradiance (UHI) blue light: highlighting the potential of a novel LED-based device for short antifungal treatments of food contact surfaces. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:415–424. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11718-9>
- Lee J-I, Kim S-S, Kang D-H (2022) The combined effect of folic acid and 365-405 nm light emitting diode for inactivation of foodborne pathogens and its bactericidal mechanisms. *Int J Food Microbiol* 373:109704. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109704>
- Leslie SB, Teter SA, Crowe LM, Crowe JH (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1192:7–13. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90136-8)
- Locey KJ, Lennon JT (2016) Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci* 113:5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>

- Lovelock JE, Bishop MWH (1959) Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature* 183:1394–1395. <https://doi.org/10.1038/1831394a0>
- Lovelock JE, Polge C (1954) The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J* 58:618–622
- McKenzie K, Maclean M, Grant MH, Ramakrishnan P, MacGregor SJ, Anderson JG (2016) The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. *Microbiol Read Engl* 162:1680–1688. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000350>
- Medeiros FGM, Correia RTP, Dupont S, Beney L, Pedrini MRS (2018) Curcumin and fisetin internalization into *Saccharomyces cerevisiae* cells via osmoporation: impact of multiple osmotic treatments on the process efficiency. *Lett Appl Microbiol* 67:363–369. <https://doi.org/10.1111/lam.13045>
- 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. <https://doi.org/10.1002/bit.10706>
- Mille Y, Beney L, Maréchal PA, Gervais P (2000) Effect of rehydration on viability of *Escherichia coli* submitted to an hyperosmotic shock. *Comp Biochem Physiol Part A Supplement* 1:104
- Miller DP, de Pablo JJ, Corti H (1997) Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm Res* 14:578–590
- Mugnier J, Jung G (1985) Survival of Bacteria and Fungi in Relation to Water Activity and the Solvent Properties of Water in Biopolymer Gels. *Appl Environ Microbiol* 50:108–114. <https://doi.org/10.1128/aem.50.1.108-114.1985>
- Nguyen N-P-T, Raynaud C, Meynial-Salles I, Soucaille P (2018) Reviving the Weizmann process for commercial n-butanol production. *Nat Commun* 9:3682. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05661-z>
- Ozen M, Dinleyici E c. (2015) The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes* 6:159–165. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0103>
- Palmfeldt J, Hahn-Hägerdal B (2000) Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *Int J Food Microbiol* 55:235–238. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00176-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00176-8)
- Pedrini M, Dupont S, Camara A, Beney L, Gervais P (2014) Osmoporation: a simple way to internalize hydrophilic molecules into yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1271–1280. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5386-8>
- Poirier I, Marechal P, Gervais P (1997) Effects of the kinetics of water potential variation on bacteria viability. *J Appl Microbiol* 82:101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb03303.x>
- Raise A (2021) Développement d'un procédé de production de bactéries probiotiques extrêmement sensibles à l'oxygène. Université de Bourgogne Franche-Comté

- Raise A, Dupont S, Iaconelli C, Caliri C, Charriau A, Gervais P, Chambin O, Beney L (2020) Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract. *J Drug Deliv Sci Technol* 56:101608. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101608>
- Ribeiro RA, Vitorino MV, Godinho CP, Bourbon-Melo N, Robalo TT, Fernandes F, Rodrigues MS, Sá-Correia I (2021) Yeast adaptive response to acetic acid stress involves structural alterations and increased stiffness of the cell wall. *Sci Rep* 11:12652. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92069-3>
- Ribert P (2021) Compréhension de la stabilité de levures sèches actives au travers des phénomènes de déshydratation et de réhydratation par des approches biophysiques et microbiologiques. Université de Bourgogne Franche-Comté
- Ribert P, Dupont S, Roudaut G, Beney L (2021) Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*
- Rodríguez-Vargas S, Sánchez-García A, Martínez-Rivas JM, Prieto JA, Rande-Gil F (2007) Fluidization of Membrane Lipids Enhances the Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to Freezing and Salt Stress. *Appl Environ Microbiol* 73:110–116. <https://doi.org/10.1128/AEM.01360-06>
- Rozali SNM, Milani EA, Deed RC, Silva FVM (2017) Bacteria, mould and yeast spore inactivation studies by scanning electron microscope observations. *Int J Food Microbiol* 263:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.008>
- Schneiter R, Brügger B, Sandhoff R, Zellnig G, Leber A, Lampl M, Athenstaedt K, Hrastnik C, Eder S, Daum G, Paltauf F, Wieland FT, Kohlwein SD (1999) Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (ESI-MS/MS) Analysis of the Lipid Molecular Species Composition of Yeast Subcellular Membranes Reveals Acyl Chain-Based Sorting/Remodeling of Distinct Molecular Species En Route to the Plasma Membrane. *J Cell Biol* 146:741–754. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.4.741>
- Setlow P, Johnson EA (2012) Spores and Their Significance. In: *Food Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 45–79
- Shao Y, Gao S, Guo H, Zhang H (2014) Influence of culture conditions and preconditioning on survival of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ND02 during lyophilization. *J Dairy Sci* 97:1270–1280. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7536>
- Shirai A, Watanabe T, Matsuki H (2017) Inactivation of foodborne pathogenic and spoilage microorganisms using ultraviolet-A light in combination with ferulic acid. *Lett Appl Microbiol* 64:96–102. <https://doi.org/10.1111/lam.12701>
- 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-Biomembr* 1768:1600–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.017>
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, Blugeon S, Bridonneau C, Furet J-P, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P (2008) *Faecalibacterium prausnitzii*

- is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci* 105:16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Steele RV (2007) The story of a new light source. *Nat Photonics* 1:25–26. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2006.44>
- Sun WQ, Leopold AC (1997) Cytoplasmic Vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 117:327–333. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00271-X)
- Sztejn JM, Takeo T, Nakagata N (2018) History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 82:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.008>
- They T, Beney L, Grangeteau C, Dupont S (2023) Sporicidal efficiency of an ultra-high irradiance (UHI) near UV/visible light treatment: An example of application to infected mandarins. *Food Control* 147:109568. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109568>
- Tunnacliffe A, Lapinski J (2003) Resurrecting Van Leeuwenhoek’s rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:1755–1771. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1214>
- Valdivia RH, Schekman R (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10287–10292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834246100>
- van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* 59:304–322. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.304-322.1995>
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 94:13804–13809. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13804>
- Vollmerhausen TL, Conneely A, Bennett C, Wagner VE, Victor JC, O’Byrne CP (2017) Visible and UVA light as a potential means of preventing *Escherichia coli* biofilm formation in urine and on materials used in urethral catheters. *J Photochem Photobiol B* 170:295–303. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.018>
- Wang Y, Corrieu G, Béal C (2005) Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *J Dairy Sci* 88:21–29. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72658-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72658-8)
- Wiemken A (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* 58:209–217. <https://doi.org/10.1007/BF00548935>
- Yoshida A, Sasaki H, Toyama T, Araki M, Fujioka J, Tsukiyama K, Hamada N, Yoshino F (2017) Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis* pigment. *Sci Rep* 7:5225. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05706-1>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148418>

### 3.6. *Expérience dans l'animation de la recherche*

L'animation de la recherche regroupe diverses activités qui incombent à un enseignant-chercheur. Ces activités incluent l'encadrement et la supervision d'étudiants, l'établissement et l'animation de collaborations scientifiques, le montage et le pilotage de projets scientifiques et enfin l'implication dans des responsabilités collectives relatives à la recherche. Les prochains paragraphes seront dédiés à ces activités. Pour chacune de ces activités, des données factuelles ainsi que mon implication seront présentées.

#### 3.6.1. Encadrement et supervision d'étudiants

Depuis mon recrutement comme Maître de Conférences à AgroSup Dijon en 2016, j'ai eu l'opportunité de participer à l'encadrement/la supervision de stagiaires, de doctorants et de post-doctorants. Mon implication dans les encadrements d'étudiants de Master 2 (8 depuis 2016) s'est traduit par la réflexion sur la définition des sujets expérimentaux, l'organisation de la stratégie expérimentale, l'analyse des résultats ainsi que leur valorisation lorsque cela été possible. Cette implication reposait également sur la formation expérimentale des étudiants et sur la réalisation de réunions régulières pour échanger sur l'avancée des travaux. Mon implication sur l'encadrement de doctorants et de post-doctorants a reposé sur les mêmes activités tout en veillant cependant à inciter les étudiants à apporter leurs propres contributions sur ces différents aspects. Cette démarche d'accompagnement me tient particulièrement à cœur afin d'accroître les compétences des étudiants. Depuis mon recrutement, j'ai co-encadré officiellement 2 thèses (Audrey Raise et Pauline Ribert) et participé à l'encadrement de 2 autres thèses (Aurore Bodzen et Richtier Gonçalves da Cruz). J'ai également supervisé le travail de 3 post-doctorants (Cédric Grangeteau, Emilie Lang et Thibaut Théry). La liste des étudiants encadrés ainsi que les sujets traités sont présentés ci-dessous :

#### Etudiants niveau Master 2

- *janvier 2016 à juin 2016 : Rania Allouche (Master 2 Recherche Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Brest)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (50%)** – Odile Chambin (50%)

Sujet de recherche : Stabilisation de bactéries probiotiques extrêmement sensibles à l'oxygène par compression.

- *janvier 2017 à juin 2017 : Adama Soro (Master 2 Recherche Sciences des Aliments, Sensorialité et Comportement, Dijon)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (50%)** – Philippe Cayot (50%)

Sujet de recherche : Analysis of antioxydant capacity of differents extracts of yeasts.

- *janvier 2018 à juin 2018 : Jessica Lourenço (Master 2 MP2 Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes, Dijon)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (33%)** – Hervé Alexandre (33%) – Géraldine Klein (33%)

Sujet de recherche : Study of the cell-cell contact between yeast species of wine interest.

- *janvier 2018 à juin 2018 : Fairouz Yahou (Master 2 MP2 Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes, Dijon)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (100%)**

Sujet de recherche : Rôle des stérols dans la résistance des levures au séchage et à l'oxydation.

- *janvier 2019 à juin 2019 : Basile Veaucher (Master 2 MP2 Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes, Dijon)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (50%)** – Thomas Karbowiak (50%)

Sujet de recherche : Stratégies de protection et de libération de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène.

- *janvier 2021 à juin 2021 : Rania Ayachi (Master 2 Sciences, Technologies, Santé, Clermont-Ferrand)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (100%)**

Sujet de recherche : Utilisation de la lumière visible à haute intensité pour la décontamination microbienne.

- *janvier 2022 à juin 2022 : Slimane Walid Saïdi (Master 2 Microbiology, Clermont-Ferrand)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (50%)** – Odile Chambin (50%)

Sujet de recherche : Etude des paramètres de compression sur la stabilité de *Bifidobacterium longum* sous forme de comprimés.

- *janvier 2022 à juin 2022 : Chloé Abry (Master 2 Procédés Fermentaires pour l'Agro-Alimentaire, Dijon)*

Encadrement : **Sébastien Dupont (100%)**

Sujet de recherche : Impact de traitements lumineux à haute intensité sur des matrices alimentaires végétales.

#### Doctorants et post-doctorants

- *2016-2017 : Encadrement du séjour doctoral de Richtier Gonçalves da Cruz (doctorant de l'université de Sao Paulo, Brésil) dans le cadre d'une thèse sandwich Brésil-France*

Durée : 3 ans dont une année complète de séjour à Dijon

Encadrement : Thais M.F.S. Vieira (50%) – Laurent Beney (50%) (J'ai participé à l'encadrement du doctorant lors de son séjour à Dijon sans être dans la direction de thèse)

Sujet de recherche : Caractérisation du potentiel antioxydant d'extraits naturels végétaux par l'utilisation de levures *Saccharomyces cerevisiae*.

Valorisation : 2 publications (da Cruz *et al.*, 2019 ; Cavalaro *et al.*, 2019)

- *2017-2017 : Post-doctorat de Cédric Grangeteau*

Encadrement : **Sébastien Dupont (50%)** – Laurent Beney (50%)

Nature du financement : projet AgroSup Dijon

Sujet de recherche : Compréhension des effets cellulaires de la lumière visible sur *Saccharomyces cerevisiae* pour le développement d'un procédé durable de décontamination fongique.

Valorisation : 1 publications (Grangeteau *et al.*, 2018)

- *2017-2021 : Thèse d'Aurore Bodzen*

Encadrement : Patrick Gervais (50% - Directeur) – Laurent Beney (50%-Co-directeur) (J'ai participé à l'encadrement de la doctorante sans être dans la direction de thèse)

Nature du financement : thèse CIFRE financée par la société Indigo Therapeutics

Sujet de recherche : Optimisation de la production de bactéries probiotiques déshydratées.

Valorisation : 3 publications (Bodzen *et al.*, 2020, 2021a et 2021b) et 1 brevet (FR3108122A1)

- *2017-2021 : Thèse d'Audrey Raise*

Encadrement : Laurent Beney (50% - Directeur) – **Sébastien Dupont (50%-Co-directeur)**

Nature du financement : projet ANR DOPEOS

Sujet de recherche : Développement et optimisation d'un procédé de production de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène pour leur utilisation industrielle.

Valorisation : 1 publication (Raise *et al.*, 2021) et 1 brevet (FR2013684)

- *2018-2020 : Post-doctorat d'Emilie Lang*

Encadrement : **Sébastien Dupont (50%)** – Laurent Beney (50%)

Nature du financement : projet de maturation Sayens IDLux

Sujet de recherche : Développement d'un procédé de décontamination fongique par l'utilisation de lumière visible.

Valorisation : 1 publications (Lang *et al.*, 2022)

- *2018-2021 : Thèse de Pauline Ribert*

Encadrement : Laurent Beney (50% - Directeur) – **Sébastien Dupont (50% - Co-directeur)**

Nature du financement : thèse CIFRE financée par la société Philéo, filiale de Lesaffre

Sujet de recherche : Caractérisation et modélisation des phénomènes de déshydratation et de réhydratation de levures probiotiques *Saccharomyces cerevisiae* : approches biophysique et microbiologique.

Valorisation : 1 publication (Ribert *et al.*, 2021) et 1 publication en cours de finalisation.

- *2019-2021 : Post-doctorat de Thibaut Théry*

Encadrement : **Sébastien Dupont (100%)**

Nature du financement : projet ANR GreenDeconta

Sujet de recherche : Utilisation de la lumière visible à haute intensité pour la destruction de micro-organismes d'altération des aliments et des matières premières.

Valorisation : 2 publications (Lang *et al.*, 2022 ; Thery *et al.*, 2023) et 1 publication en cours de finalisation.

- *Depuis décembre 2022 : Thèse de Léa Savard*

Encadrement : Laurent Beney (50% - Directeur) – **Sébastien Dupont (50%-Co-directeur)**

Nature du financement : projet ANR ClostAbat

Sujet de recherche : Développement de procédés durables pour lutter contre *Clostridium perfringens* et *Clostridioides difficile* dans la filière viande.

### 3.6.2. Collaborations scientifiques

La recherche est rarement une activité solitaire et il est souvent profitable de réunir des compétences et connaissances de différentes disciplines pour répondre à des questionnements scientifiques. Au-delà de collaborations internes à mon UMR de recherche, j'ai été et suis impliqué dans des collaborations scientifiques avec des chercheurs d'autres équipes de recherche. Ces collaborations ainsi que les valorisations qui ont pu être produites sont listées ci-dessous :

#### Collaborations nationales

- **UMR SayFood**, Université Paris-Saclay (F. Fonseca) : Meneghel *et al.*, 2017.
- **UMR CSGA**, Université de Bourgogne Franche-Comté (J-F. Ferveur et J-P. Charles) : Grangeteau *et al.*, 2018 ; Dupas *et al.*, 2020.
- **Institut de Chimie Moléculaire, UMR 6302**, Université de Bourgogne (P. Fleurat-Lessard) : Dupont *et al.*, 2021.
- **UMR Agroécologie**, Université de Bourgogne Franche-Comté (F. Simon-Plas) : Dupont *et al.*, 2021.
- **Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques membranaires**, Université de Poitiers (T. Ferreira) : Pineau *et al.*, 2009 ; Deguil *et al.*, 2011 ; Dupont *et al.*, 2011 ; Dupont *et al.*, 2012.

#### Collaborations internationales

- **Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos**, Valence, Espagne (J.A. Prieto) : García-Marqués *et al.*, 2016.
- **Department of Agri-Food Industry, Food & Nutrition**, University of Sao Paulo, Brésil (T.M.F.S. Vieira) : da Cruz *et al.*, 2019 ; Cavalaro *et al.*, 2019.
- **Institute of Microbiology and Biotechnology**, University of Latvia, Lettonie (A. Rapoport) : Dupont *et al.*, 2014, Rapoport *et al.*, 2019.
- **Departamento de Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brésil (M.R. da Silva Pedrini) : Pedrini *et al.*, 2014 ; de Câmara *et al.*, 2016 ; Medeiros *et al.*, 2018 ; Medeiros *et al.*, 2019 ; de Andrade *et al.*, 2022a ; de Andrade *et al.*, 2022b ; de Andrade *et al.*, 2022c.

Parmi ces collaborations, certaines ont été ponctuelles sur la base de l'utilisation d'une méthodologie et d'une expertise dans le cadre d'une étude précise. Il y a cependant également des collaborations plus durables. A titre d'exemple, la collaboration avec M.R. da Silva Pedrini de l'université brésilienne de Rio Grande du nord a été initiée il y a une dizaine d'années et se poursuit encore actuellement. Cette collaboration porte sur l'utilisation de perturbations hyperosmotiques pour internaliser des molécules d'intérêt dans des levures. Je suis très actif dans le maintien de cette collaboration, notamment en accueillant régulièrement des étudiants formés au sein de son laboratoire.

### 3.6.3. Montage et pilotage de projet

A l'heure actuelle, il est à mon sens très compliqué de mener une recherche de pointe dans le domaine de la microbiologie et des procédés sans obtenir de financement pour réaliser les expérimentations. C'est donc naturellement que je me suis impliqué dans le montage et le pilotage de projets de recherche. Ces projets sont listés ci-dessous :

Projet	Dates	Description/Thème	Financement	Rôle dans le projet
Projet campus PHC-Osmose	01/01/2015 – 31/12/2015	Projet collaboratif France-Lettonie avec le Pr Alexander Rapoport sur la thématique du séchage des levures	6 k€ (déplacement de chercheurs)	Porteur et responsable scientifique français
Projet Qualiment Anastab	01/01/2016 – 30/06/2016	Conservation de bactéries strictement anaérobies	46 k€ (salaire technicien + fonctionnement)	Responsable scientifique
Projet AgroSup	01/09/2017 – 31/08/2018	Compréhension des mécanismes de photo-oxydation cellulaire	10 k€ (fonctionnement)	Porteur et responsable scientifique
ANR DOPEOS	01/09/2017 – 31/08/2020	Développement et Optimisation d'un procédé de Production de bactéries Extrêmement Sensibles à l'Oxygène pour leur utilisation industrielle	260 k€ pour l'UMR PAM (salaire doctorant + fonctionnement) (budget total du projet : 720 k€)	Co-rédacteur du projet Coordinateur d'une tâche Co-directeur d'une thèse
Maturation IDLux	01/02/2018 – 31/01/2020	Développement d'un procédé de décontamination fongique par l'utilisation de lumière visible	130 k€ (salaire Ingénieur de recherche + fonctionnement)	Responsable scientifique
Thèse CIFRE Lesaffre	01/09/2018 – 31/08/2021	Caractérisation et modélisation des phénomènes de déshydratation et de réhydratation de levures probiotiques <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	210 k€ (salaire doctorant + fonctionnement)	Co-rédacteur du projet Co-directeur d'une thèse
Contrat industriel Nextbiotix	01/10/2018 – 31/03/2019	Mise en œuvre industrielle de la bactérie <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	144 k€ (salaire Ingénieur de recherche + technicien + fonctionnement)	Responsable scientifique
ANR GreenDeconta	01/03/2019 – 31/09/2021	Décontamination de formes sporulées de bactéries et de champignons par l'utilisation de la lumière visible	174 k€ (salaire post-doc + fonctionnement)	Porteur et responsable scientifique du projet

ANR ClostAbat	01/01/2022 – 31/12/2025	Caractérisation des risques liés à <i>Clostridium perfringens</i> et <i>Clostridium difficile</i> dans les secteurs bovin, porcin et avicole des abattoirs.	193 k€ pour l'UMR PAM (salaire + fonctionnement) (budget total du projet : 760 k€)	Participation à une tâche du projet Co-directeur d'une thèse
	01/01/2022 – 31/12/2024	Compréhension des effets non intentionnels d'une technologie émergente de traitement par photo-oxydation comme alternative aux intrants chimiques pour deux filières agro-alimentaires majeures : la vitiviniculture et les céréales.	80 k€ pour l'UMR PAM (salaire + fonctionnement) (budget total du projet : 240 k€)	Coordinateur du projet

En début de carrière, j'ai principalement déposé des projets associés à des volumes financiers modestes. Ces projets faiblement sélectifs m'ont cependant permis de réaliser des expérimentations préliminaires qui ont ensuite la base de dépôts de projets plus ambitieux. À titre d'exemple, j'ai obtenu en 2017 un financement de 10 k€ sur un appel à projet émis par mon établissement, AgroSup Dijon. Le projet déposé portait sur la compréhension des mécanismes de photo-oxydation cellulaire. Cette thématique n'était alors pas travaillée au sein de mon laboratoire. Les premiers résultats obtenus lors de ce projet ont permis ensuite de mener une étude dans le cadre d'un projet de maturation avec la SATT Sayens (projet IDLux, 130 k€, 2018-2020). J'ai également obtenu en 2018 un projet ANR jeune chercheur portant sur ce thème (2019-2021, 174 k€). Cette thématique de recherche est maintenant bien ancrée dans le laboratoire avec deux projets en cours incluant des volets portant sur l'utilisation de la lumière visible pour la décontamination microbienne : le projet ANR ClostAbat (2022-2025, 193 k€) et le projet inter-Carnot EFFINOX (2022-2024, 80 k€).

#### 3.6.4. Responsabilités collectives liées à la recherche

À la suite de mon recrutement, j'ai rapidement eu la volonté de m'impliquer dans la stratégie collective de recherche de mon UMR. C'est pourquoi j'ai accepté des responsabilités lorsque celles-ci m'ont été proposées. J'ai été responsable entre 2016 et 2020 d'un axe transversal de recherche de l'UMR PAM et suis depuis 2018 le directeur adjoint de l'équipe PMB de l'UMR.

- *2016-2020 : Responsable de l'axe transversal de recherche « Oxydation des micro-organismes, des aliments et du vin » au sein de l'UMR PAM*

Afin de dynamiser les collaborations entre les 4 équipes de l'UMR PAM, quatre axes transversaux de recherche ont été créés. L'axe dont j'étais responsable vise à comprendre et caractériser les phénomènes d'oxydation qui peuvent se dérouler au sein des micro-organismes lors de perturbations technologiques mais aussi ceux qui peuvent se dérouler au sein de différentes

matrices (aliments, vins...). Un des rôles des responsables d'axes transversaux est d'attribuer des financements (sur les fonds de l'UMR) de Master 2 Recherche pour initier des projets collaboratifs entre les membres des différentes équipes de l'UMR. Dans le cadre de cet axe, j'ai également organisé deux séminaires sur les techniques de caractérisation des phénomènes oxydatifs. Sans prendre en compte les étudiants, cet axe regroupe 14 enseignants-chercheurs de l'UMR.

- *Depuis 2018 : Co-direction de l'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques*  
L'équipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques est l'une des 4 équipes de l'UMR PAM. Cette équipe est actuellement composée de 13 enseignants-chercheurs (7 professeurs et 6 maîtres de conférences), 3 ingénieurs, 2 techniciens et 1 secrétaire. À ces personnes s'ajoutent ensuite les personnels contractuels, les doctorants, les post-doctorants et les stagiaires. Concernant mes activités liées à cette responsabilité, je participe conjointement avec le directeur de l'équipe à l'animation, à la gestion de l'équipe et à la stratégie scientifique de l'équipe. L'année 2022 a été particulièrement dense en termes d'activités puisque le laboratoire a été évalué par le comité HCERES. À cette occasion, je me suis fortement impliqué dans la rédaction du rapport d'auto-évaluation de l'équipe ainsi que dans la définition des objectifs de notre équipe pour le prochain contrat.

### 3.7. Sélection de 6 articles emblématiques de la recherche réalisée

Les noms soulignés correspondent aux étudiants que j'ai encadrés pendant leurs travaux de thèse ou de post-doctorat. Les astérisques (\*) indiquent les publications pour lesquelles je suis l'auteur correspondant.

**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. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798(5), 975-985.

**Dupont, S.**, Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis : A fungal pathway for life on land? *Evolution*, 66(9), 2961-2968.

da Cruz, R. G., Beney, L., Gervais, P., de Lira, S. P., Ferreira de Souza Vieira, T. M., & **Dupont, S.\*** (2019). Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. *Food Chemistry*, 277, 698-705.

Raise, A., **Dupont, S.\***, Iaconelli, C., Caliri, C., Charriau, A., Gervais, P., Chambin, O., & Beney, L. (2020). Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56(A).

Ribert, P., **Dupont, S.**, Roudaut, G., & Beney, L. (2021). Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16-17), 6409-6418.

Thery, T., Grangeteau, C., Beney, L., **Dupont, S.\***(2023). Sporicidal efficiency of an ultra-high irradiance (UHI) near UV/visible light treatment: an example of application to infected mandarins. *FOOD CONTROL*, 147(109568).



## Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration

Sebastien Dupont<sup>a</sup>, Laurent Beney<sup>a,\*</sup>, Jean-Francois Ritt<sup>b</sup>, Jeannine Lherminier<sup>c</sup>, Patrick Gervais<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Centre de Recherche en Infectiologie, Division Microbiologie, Université de Laval, Boulevard Laurier, Québec, Canada G1V 4G2

<sup>c</sup> UMR Plante-Microbe-Environnement Université de Bourgogne/1088 INRA/5184 CNRS, INRA, BP 86510, 21065 DIJON Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 October 2009

Received in revised form 12 January 2010

Accepted 20 January 2010

Available online 28 January 2010

#### Keywords:

Dehydration kinetic

Cell survival

Microdomain

Confocal microscopy

Electron microscopy

### ABSTRACT

In this study, we investigated the kinetic and the magnitude of dehydrations on yeast plasma membrane (PM) modifications because this parameter is crucial to cell survival. Functional (permeability) and structural (morphology, ultrastructure, and distribution of the protein Sur7-GFP contained in sterol-rich membrane microdomains) PM modifications were investigated by confocal and electron microscopy after progressive (non-lethal) and rapid (lethal) hyperosmotic perturbations. Rapid cell dehydration induced the formation of many PM invaginations followed by membrane internalization of low sterol content PM regions with time. Permeabilization of the plasma membrane occurred during the rehydration stage because of inadequacies in the membrane surface and led to cell death. Progressive dehydration conducted to the formation of some big PM pleats without membrane internalization. It also led to the modification of the distribution of the Sur7-GFP microdomains, suggesting that a lateral rearrangement of membrane components occurred. This event is a function of time and is involved in the particular deformations of the PM during a progressive perturbation. The maintenance of the repartition of the microdomains during rapid perturbations consolidates this assumption. These findings highlight that the perturbation kinetic influences the evolution of the PM organization and indicate the crucial role of PM lateral reorganization in cell survival to hydric perturbations.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Liquid water is a requirement for life on Earth and is the main factor of interest for researchers looking for life on other planets. However, diverse organisms, including tardigrades, nematodes, yeasts, and higher and lower plants, can survive in a dehydrated environment for extended periods. The mechanisms by which cells survive extreme dehydration are important to biological research and for stabilizing cells for biotechnological applications. The long-term preservation of biological materials is currently based on severe dehydration of the cell environment (e.g., freezing, drying, and freeze-drying) [1–3]. Dehydration is nevertheless an abiotic stress that perturbs cells and threatens survival.

The effects on cells induced by hydric perturbations are mainly a function of the severity of the treatment, and the magnitude of the perturbation determines the quantity of water that flows out of the cells. In the low-amplitude range of dehydration, most microorganisms adapt through active metabolic pathways. Osmoregulatory

pathways encompass active processes such as the high-osmolarity glycerol-signaling system through which cells monitor and adjust the internal osmotic pressure and control their shape, turgor, and relative water content [4], which allow cells to grow in concentrated media. The maximal osmotic pressure for osmoregulation varies according to microbial species and is about 15 MPa for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) [5]. Long-term preservation strategies exceed this limit and typically involve osmotic pressures between 150 and 300 MPa corresponding to water activity ( $a_w$ ) of 0.34 and 0.15, respectively. In this range of extreme dehydration, active cell responses have never been detected and cell survival is challenged considerably by the physicochemical constraints induced by the low hydric status. The structures of macromolecules and macromolecular assemblies are altered in these conditions [6], and the decrease in the cytoplasmic space caused by water outflow increases the confinement of intracellular structures and promotes aggregation phenomena [7].

Among the vital structures affected by extreme dehydration, the plasma membrane is a major target because the phospholipid bilayer structure results largely from the interaction of the lipids with the cytoplasmic and extracellular fluids. Dehydration and consequential osmotic phenomena cause movement of large quantities of water across the membrane, decreasing cell volume. For example, during hyperosmotic shock, the volume of yeast *S. cerevisiae* can be reduced

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 80 39 66 66; fax: +33 3 80 39 68 98.  
E-mail address: [laurent.beney@u-bourgogne.fr](mailto:laurent.beney@u-bourgogne.fr) (L. Beney).

by 60% within a few milliseconds [8]. This event increases the cell surface-to-volume ratio ( $s/v$ ), causing plasma membrane deformations such as ruffles, wrinkles, and surface roughness [9,10]. The fluidity and structural arrangement of membrane lipids also change; for example, their mobility decreases and the transition from the liquid lamellar to gel or hexagonal phases can occur under conditions of low water content [11–13]. These phenomena are often mentioned to explain plasma membrane permeabilization and cell death during hydric stresses [14–16].

Biological membranes have long been considered to be a fluid mixture of lipids organized in a homogenous bilayer. However, many studies reported that the plasma membrane of eukaryotic cells is highly compartmentalized laterally and that the membrane displays lipid microdomains enriched in sterols, sphingolipids, and specific raft proteins [17,18]. Lipid microdomains, so-called lipid rafts, are proposed to function in several processes including endocytosis and protein trafficking. The plasma membrane of the yeast *S. cerevisiae* comprises two different nonoverlapping lateral plasma membrane compartments. The first is occupied by the protein Pma1 and is called MCP (membrane compartment occupied by Pma1p) [19] or RMC P (raft-based membrane compartment P) [20]. The second contains the arginine transporter Can1 and is named MCC (membrane compartment occupied by Can1p) or RMC C (raft-based membrane compartment C). Grossmann et al. [21] have shown that 21 proteins cluster within or associate with the MCC ergosterol-rich membrane compartment. In physiological conditions, when fused to GFP, these proteins form a patch at the cell surface. The effect of severe perturbations on the plasma membrane lateral organization has never been investigated.

Several studies have shown that decreasing the rate of perturbation improves cell survival after extreme dehydration. Such kinetic effect was observed during dehydrations performed by drying [22] or hyperosmotic treatments [13,23] and suggest that the structural evolution of the membrane depends on the dehydration rate. The effects of the kinetics concern essentially the rate of osmotic water transfer and potentially the physical reorganization of cellular structures during dehydration. In the present study, we endeavored to clarify the impact of the magnitude and the kinetic of dehydration on plasma membrane reorganization and cell survival. We used yeast cells because they experience hydric fluctuations in their natural environment and are a convenient model to investigate the effect of hyperosmotic perturbations in eukaryotic organisms. Three dehydration conditions were chosen: 30 MPa ( $a_w = 0.8$ ), corresponding to a sublethal level but out of the osmoregulatory range, and 110 MPa ( $a_w = 0.45$ ) and 166 MPa ( $a_w = 0.3$ ), corresponding to severe dehydration close to the water status of dried cells. Dehydration was induced by progressively increasing the concentration of glycerol in the extracellular solution (slope) or within a few milliseconds (shock). This protocol allowed us to induce severe cell dehydration in a liquid medium, which is convenient for microscopic observations [24]. Functional and structural investigations of the plasma membrane are necessary to understand the mechanisms operating during dehydration perturbation. To this end, we used fluorescence microscopy (epifluorescence and confocal) to observe modifications of the yeast plasma membrane during dehydration [25]. These modifications included changes in plasma membrane permeability, Sur7-GFP (contained in MCC) repartition, and membrane delocalization. To better understand the effect of dehydration kinetic, we used transmission electron microscopy (TEM) in cases where the kinetics influenced the fluorescent staining and survival rates. Our results show that slow perturbations led to the lateral reorganization of the plasma membrane, which was associated with the preservation of plasma membrane integrity, whereas rapid perturbation did not allow this phenomenon. We conclude that time is required for membrane reorganization and that this event is crucial for cell survival in response to severe dehydration.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strain and culture conditions

*S. cerevisiae* strain BY 4742 (Euroscarf, Frankfurt, Germany) was used in this study. Cells were grown aerobically at 25 °C in 250 mL conical flasks containing 100 mL of Malt Wickerham modified medium (MW) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The MW medium contained 10 g glucose, 3 g pancreatic peptone, 3 g yeast extract, and 1.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in 1 L of water–glycerol, which had an osmotic pressure of 1.4 MPa. This osmotic pressure has been recommended for the optimal growth of *S. cerevisiae* [26]. A subculture (1 mL) was transferred into a conical flask containing MW medium, and cultures were placed on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) at 250 rpm for 24 h and allowed to grow to the early stationary phase. The final population was estimated at about  $10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

Plasmid amplification was carried out in the *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  host, grown at 37 °C in Luria–Bertani medium supplemented with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin. The *S. cerevisiae* transformants were selected on Yeast Nitrogen Base casa plates (0.67% Difco yeast nitrogen base without amino acids, 0.5%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1% glucose, 0.1% Difco Bacto Casamino acids, and 1.8% agar).

### 2.2. Yeast transformation

The strain BY4742 was transformed with the plasmid Ylp211-SUR7GFP after linearization by *Eco*52I. This plasmid was a generous gift from W. Tanner (University of Regensburg, Cell Biology and Plant Physiology, Regensburg, Germany) and was first transferred into *E. coli* DH5 $\alpha$  and selected on Luria–Bertani plates supplemented with ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The *S. cerevisiae* strain transformation with the linearized Ylp211SUR7GFP plasmid was performed by the LiAc method [27].

### 2.3. Preparation of binary water–glycerol solutions of different osmotic pressures

The solute used in all experiments to perform hyperosmotic treatments was glycerol (Sigma-Aldrich).

The mass of solute to be added to 1000 g of distilled water to obtain the desired water activity ( $a_w$ ) was calculated using the Norrish equation [28]:

$$a_w = (1 - X_s)e^{-KX_s^2}$$

where  $X_s$  is the molar fraction of the solute and  $K$  is the Norrish coefficient of the solute used to increase the osmotic pressure. For glycerol,  $K = 1.16$  [29]. Osmotic pressure ( $\pi$ ) is related to the water activity by the following equation:

$$\pi = \frac{-RT \ln a_w}{V_w}$$

where  $R$  is the universal gas constant ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $T$  is the temperature (K) and  $V_w$  is the partial molar volume of water ( $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ). Table 1 presents the quantity of glycerol used to prepare the solutions of different osmotic pressures.

**Table 1**  
Preparation of binary water–glycerol solutions of different osmotic pressures.

Osmotic pressure (MPa)	Water activity	Glycerol weight (g) for 1000 g of water
1.4	0.99	51
15	0.9	513
30	0.8	1063
110	0.45	3986
166	0.3	6654

The osmotic pressure of all solutions was checked with a dew-point osmometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

#### 2.4. Osmotic treatments

Three levels of osmotic treatments were used: moderate (30 MPa), which is slightly higher than that allowing osmoregulation, and severes (110 and 166 MPa).

Samples (20 mL) of culture were centrifuged (5 min, 2200 ×g), washed twice in the binary water–glycerol mixture (1.4 MPa), and the pellets were resuspended in 10 mL of the same medium. For rapid perturbations (shock), 1 mL aliquots of this suspension were placed in microsample tubes, which were then centrifuged (10 min, 5100 ×g) and the supernatant was removed. Hyperosmotic shock was induced by quickly introducing 1 mL of a binary water–glycerol solution (final osmotic pressure of 30, 110, or 166 MPa) to the pellets. For the progressive perturbations (osmotic slope of 0.086 MPa s<sup>-1</sup>), the external osmotic pressure was increased linearly by slowly adding pure glycerol to an agitated conical flask containing the initial cell suspension at 1.4 MPa; the glycerol solution was injected by a syringe pump (KD Scientific, Boston, MA, USA). The cells were maintained for various maintenance periods under hyperosmotic conditions before rehydration. For rapid rehydration, the hyperosmotic solution was removed from the microsample tube after centrifugation (10 min, 5100 ×g) and 1 mL of the binary water–glycerol solution (1.4 MPa) was introduced suddenly to the cell pellet. Progressive rehydration was performed using successive dilutions in solutions with decreasing osmotic pressure to 1.4 MPa.

Cell suspensions, rehydration solutions, and shock solutions were kept in an air-conditioned room at 25 °C. The temperature of the solutions was checked using a thermocouple.

#### 2.5. Measurement of yeast viability

Yeast viability was estimated in triplicate by the CFU method. After osmotic treatment, fully rehydrated cells were diluted serially and the appropriate dilutions were plated in MW medium with 15 g L<sup>-1</sup> of agar. CFU were counted after incubation for 36 h at 25 °C. The initial cell suspension was used as the control.

#### 2.6. Fluorescence microscopy

Propidium iodide (PI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to assess plasma membrane integrity. This probe stains nucleic acids after permeabilization of the plasma membrane. PI was dissolved in distilled water (10 mg mL<sup>-1</sup>) to prepare the stock solution, and 200 µg of PI was used to stain 10<sup>8</sup> cells. PI was added to the cell suspension before, during, or 60 min after the dehydration shock and after rehydration (Fig. 8A). This protocol allowed us to estimate the changes in the membrane permeability during and after hydric perturbation. For staining during the hydric stress, the probe was added to the hyperosmotic solution before induction of the perturbation. A Nikon Eclipse TE 2000 E epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with spectral camera Nuance CRI was used to observe cells. Images were acquired with a ×40 (NA: 0.95) Plan Apo objective (Nikon) and collected with Nuance software (Nikon). Black and white images were captured to observe the total cell population. A monochromatic epifilter (540–580 nm and 600–660 nm excitation and emission wavelengths, respectively) was used to observe cells stained with PI.

N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM 4-64) (Invitrogen) is a membrane probe that is not fluorescent in an aqueous medium and which has been extensively used to observe endovesiculation phenomena [30–32]. In our study, FM 4-64 was used to observe the delocalization of membrane lipids and changes in cell morphology. The dye was dissolved in distilled water (1 mg mL<sup>-1</sup>) to prepare the

stock solution, and 10<sup>8</sup> cells were stained with 20 µg of FM 4-64. Before staining, yeast cells were placed in the 15 MPa water–glycerol solution to stop the natural endocytosis pathway, which could perturb the observations of membrane delocalization induced by hyperosmotic treatment. This low osmotic pressure had no impact on yeast viability. A Nikon Eclipse TE 2000 U microscope with multispectral confocal head D Eclipse C1 was used to observe the cells stained with FM 4-64. Excitation was performed at 488 nm with laser He/Ar and the emission signal was recovered between 550 and 700 nm. Images were acquired with a ×60 (NA: 0.95) Plan Apo objective and a ×100 (NA: 1.4) Plan Apo oil-immersion objective (Nikon), and collected with EZ-C1 software 3.50 (Nikon).

Sur7-GFP was visualized using the same confocal microscope. Images were acquired with a ×100 (NA: 1.4) Plan Apo oil-immersion objective (Nikon), and collected with EZ-C1 software 3.50 (Nikon). Excitation was performed at 488 nm, and the emission signal was measured between 500 and 550 nm.

#### 2.7. Electron microscopy

TEM was used to assess the yeast ultrastructure just after hyperosmotic slope and shock to 110 MPa. Concentrated yeast samples were fixed for 12 h at 4 °C with 3% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in PBS for control cells (1.4 MPa) and in water–glycerol solution for cells subjected to 110 MPa osmotic pressure. Treated cells were fixed just after the end of the osmotic treatment. After washing, cells were postfixed with 0.5% OsO<sub>4</sub>–0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 1 h at 4 °C. Cells were dehydrated progressively in 30%, 50%, 70%, 90%, and 100% ethanol, 30 min for each step, impregnated with Epon, and polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections (90 nm) were obtained using an Ultracut E ultramicrotome (Reichert, Depew, NY, USA) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Polysaccharides were detected histochemically by the periodic acid–thiocarbohydrazide (TCH)–silver proteinate (PATAg) method described by Thiery [33]. Observations were performed on a Hitachi 7500 transmission electron microscope (operating at 80 kV) equipped with an AMT camera driven by AMT software (AMT, Danvers, MA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Impact of hyperosmotic treatments on yeast viability

##### 3.1.1. Kinetic and magnitude of hyperosmotic treatments influence the yeast survival

Cells were treated with the hyperosmotic conditions at 30, 110, or 166 MPa for 60 min and then rehydrated to 1.4 MPa. The dehydration and rehydration steps were achieved progressively or quickly according to 4 possible combinations (Table 2). For 30 MPa, the rates of dehydration and rehydration had almost no effect on yeast viability, which remained higher than 80%. For severe dehydrations, the survival rate depended on the kinetics of dehydration and rehydration. At 110 and 166 MPa, the best viabilities were observed after progressive dehydrations followed by progressive rehydrations (86.9% and 78.7%, respectively) and the weakest were observed when the two steps were performed quickly (12.5% and 0.3%, respectively). Intermediate viabilities were obtained after slope/shock and shock/slope cycles: 41.7% and 67.7%, respectively, for the treatments to 110 MPa, and 19.2% and 42.6%, respectively, for the treatments to 166 MPa. These results showed that the magnitude of the dehydration treatment influenced the cell viability. For severe perturbations (110 and 166 MPa), survival rates are strongly related to the perturbation kinetic of the dehydration and rehydration steps.

##### 3.1.2. First minutes after a severe hydric shock are crucial for cell survival

The effect of maintenance periods in hyperosmotic conditions on cell viability was estimated by rapid rehydration at different times

**Table 2**  
Impact of changes in the kinetics of dehydration and rehydration on yeast viability for treatments to 30, 110, and 166 MPa with a maintenance period of 60 min in hyperosmotic conditions.

Amplitude	Kinetic profiles			
30 MPa	86.0% (3.6)	86.2% (3.9)	88.2% (8.4)	83.5% (2.5)
110 MPa	86.9% (11.6)	67.7% (4.7)	41.7% (12.7)	12.5% (9.1)
166 MPa	78.7% (3.6)	42.6% (3.6)	19.2% (1.1)	0.3% (0.2)

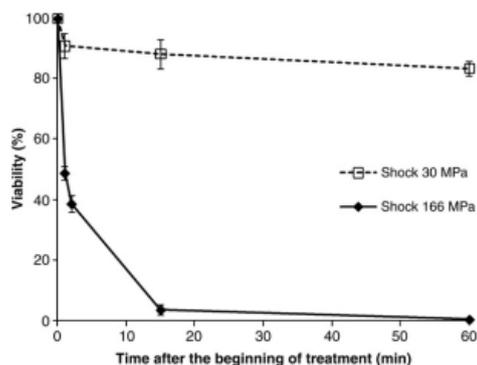
$\pi$  corresponds to the osmotic pressure of the extracellular medium. (A) Slow dehydration and slow rehydration, (B) slow dehydration and rapid rehydration, (C) rapid dehydration and slow rehydration, and (D) rapid dehydration and rapid rehydration. Survival rate was measured using the CFU method after rehydration to 1.4 MPa. The SDs were calculated from three experiments.

after the hyperosmotic shock: 1, 15, and 60 min for 30 MPa, and 1, 2, 15, and 60 min for 166 MPa (Fig. 1). For 30 MPa shock, cell viability did not evolve significantly according to maintenance periods and remained close to 85%. This result indicates that the decrease of the survival rate occurs during the first minute after the shock and that the viability is not affected by the maintenance time. After osmotic shock at 166 MPa, cell viability decreased markedly with increasing maintenance time in hyperosmotic conditions. The viability was 48.9% when cells were rehydrated 1 min after the shock and declined to 38.7%, 3.6% and 0.3% for rehydration at 2, 15 and 60 min, respectively. These results suggest that events occurring during the first minutes after severe hyperosmotic shock influence the cell survival during the rehydration.

### 3.2. Plasma membrane internalization depends on the amplitude and the kinetic of hyperosmotic treatments

#### 3.2.1. Arrest of endocytosis at 15 MPa

Endocytosis refers to the formation of vesicles in the cytosol from the plasma membrane. It is a rapid process that allows the internalization of extracellular fluids, particles, and plasma membrane proteins by invagination of the plasma membrane [32]. The yeast plasma membrane was stained by FM 4-64 and visualized using confocal microscopy to observe the membrane delocalization (Fig. 2). Initially, the probe was observed only in the plasma membrane. With



**Fig. 1.** Evolution of the viability of yeast cells during different maintenance periods after hyperosmotic shock to 30 MPa and 166 MPa. Viability was measured by the CFU method after rapid rehydration to 1.4 MPa. The cells were rehydrated for 1, 15, or 60 min after the shock to 30 MPa and for 1, 3, 15, or 60 min after the shock to 166 MPa. Error bars correspond to the SD calculated from three repeat experiments.

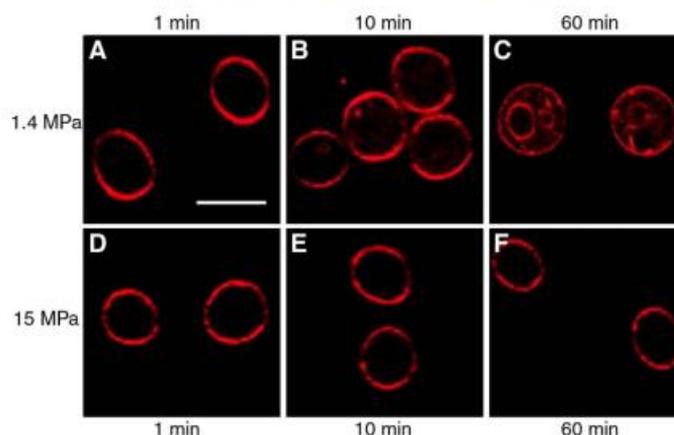
time and in iso-osmotic conditions corresponding to the osmotic pressure of the culture medium (1.4 MPa), the plasma membrane was internalized and reached intracellular compartments such as vacuoles after 60 min (Fig. 2C). The kinetic of the probe internalization is consistent with observations previously reported [34]. As endocytosis is an energy-dependent phenomenon [35], yeast placed in a 1.4 MPa water/glycerol solution possessed sufficient energetic resources. In our study, FM 4-64 staining was used to assess plasma membrane delocalization during hydric perturbations. It was necessary to arrest this phenomenon because it could disturb observations during progressive dehydration which required 30 min to reach 166 MPa. So we seek for non-lethal conditions which stopped this phenomenon. For that, we placed the cells at 15 MPa which corresponds to the limit level of yeast osmoregulation [5]. At this amplitude, staining by the FM 4-64 remained in the plasma membrane over time (Fig. 2D, E, and F).

#### 3.2.2. Induction of plasma membrane internalization by severe hyperosmotic shock

Yeasts were observed at 1, 10, and 60 min after hyperosmotic treatments. The images obtained after hyperosmotic perturbations are presented in Figs. 3 and 4.

After shock or slope to 30 MPa, the staining by FM 4-64 appeared only in the plasma membrane, and the pattern was similar to that of cells before treatment (Figs. 3 and 4). Shocks to 110 and 166 MPa led to progressive plasma membrane internalization which occurred during the maintenance period in hyperosmotic conditions. Small spots of probe were visible close to the plasma membrane 10 min after the beginning of the treatment (Fig. 3F and I). The probe was internalized deeper in the cell with time and reached intracellular compartments such as vacuoles after 60 min (Fig. 3G and J). However, membrane internalization did not affect all the cells after the shock to 110 MPa contrary to the one to 166 MPa. Indeed, a minor part of cells (~20%) did not present intracellular FM 4-64 staining after 60 min time exposure (Fig. 3G). So, these results show that the shock to 30 MPa did not induce plasma membrane delocalization, whereas shocks to 110 and 166 MPa caused plasma membrane internalization. Progressive dehydrations to 110 and 166 MPa were characterized by a peripheral staining which did not evolve over time (Fig. 4). The plasma membrane was not internalized during the 60 min following the perturbations but presented a peculiar aspect. Spots of probe were observed in the plasma membrane at the end of the progressive dehydration; these spots may correspond to large wrinkles of membrane or vesicles that stayed close to the plasma membrane.

These original results showed that hyperosmotic shock to 110 and 166 MPa induced membrane internalization during the maintenance period in hyperosmotic conditions. For these high-osmotic pressure



**Fig. 2.** Effect of an increase in osmotic pressure to 15 MPa on plasma membrane endocytosis. Representative confocal laser scanning microscopy images of yeast *Saccharomyces cerevisiae* showing evolution over the time of FM 4-64 staining in iso-osmotic conditions (A, B, and C) and after 15 MPa hyperosmotic treatment (D, E, and F) at 25 °C. Observations were performed 1, 10, and 60 min after the staining with the probe. Bar scale = 5  $\mu$ m.

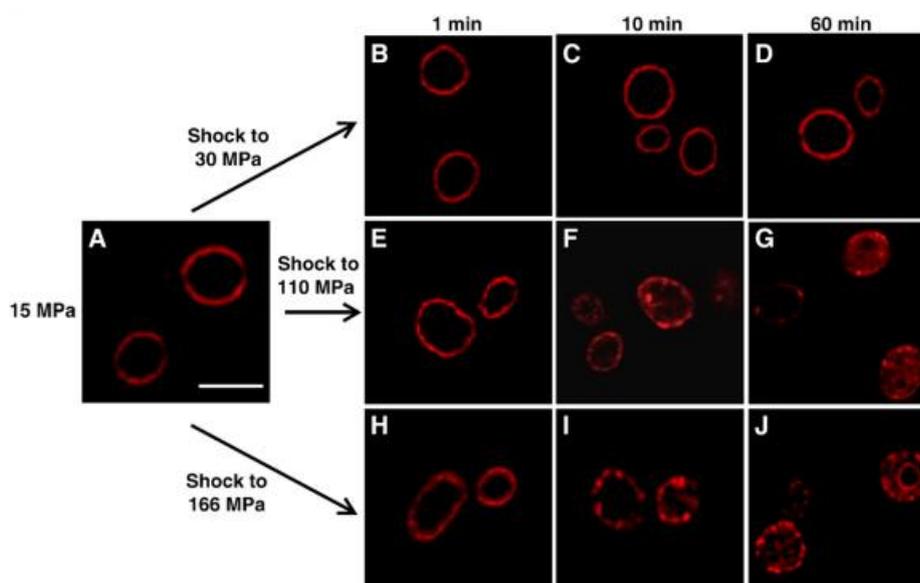
levels, the kinetic of dehydration influenced the morphological evolution of the plasma membrane.

### 3.3. Dehydration kinetic influences plasma membrane deformations

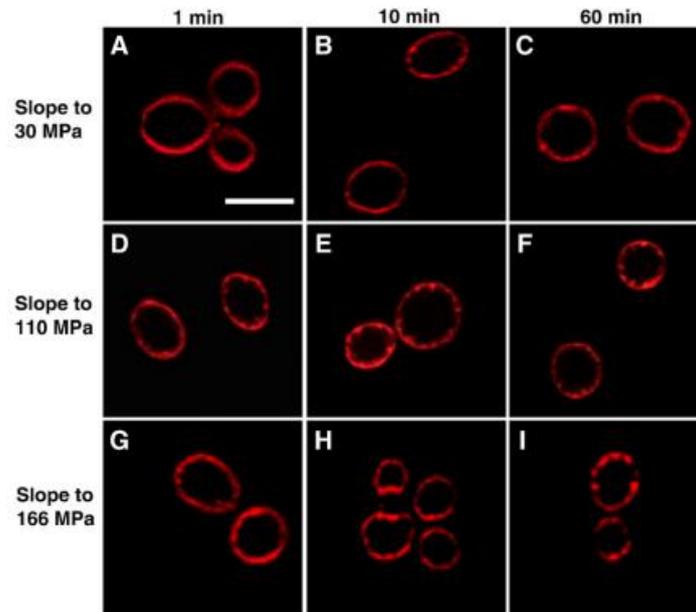
TEM was used to characterize ultrastructural changes in cases where the dehydration kinetic influenced the survival rate and the fluorescent staining by FM 4-64 (Table 2 and Figs. 3 and 4). As it was not possible to fix the cells at 166 MPa because of the high viscosity of the solutions, observations were performed on samples dehydrated to 110 MPa (Fig. 5). Cell fixation was performed just after the treatments

(slope or shock) to observe membrane modifications which occurred after the perturbations. Fixation of cells was performed with chemical fixation. This protocol can sometimes alter the structure of the plasma membrane with artificially tilted and profound invaginations, evoked by Stradalova et al. [36], caused by the osmotic effects of chemical fixatives [37]. These artifacts were not observed on the control cells and allowed reasonable comparative observations between the samples after slope and shock dehydrations.

Control cells presented an almost smooth plasma membrane with about ten curved membrane areas per cell median microscopic section that corresponded to invaginations of ~50 nm deep (Fig. 5A



**Fig. 3.** Impact of hyperosmotic shocks on plasma membrane internalization. Representative confocal laser scanning microscopy images of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* stained with the styryl dye FM 4-64 after hyperosmotic shocks to 30, 110, and 166 MPa carried out with glycerol. (A) Control cells in 15 MPa water/glycerol solution; (B), (C), and (D) correspond to cells after 30 MPa hyperosmotic shock; (E), (F), and (G) after hyperosmotic shock to 110 MPa and (H), (I), and (J) after hyperosmotic shock to 166 MPa. Cells were observed 1, 10, and 60 min after the shocks. Bar scale = 5  $\mu$ m.



**Fig. 4.** Impact of hyperosmotic slopes on plasma membrane internalization. Representative confocal laser scanning microscopy images of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* stained with FM 4-64 after hyperosmotic slopes of 30, 110, and 166 MPa carried out with glycerol. Progressive dehydrations were performed with a rate of  $0.086 \text{ MPa s}^{-1}$ . (A), (B) and (C) correspond to cells after slope to 30 MPa; (D), (E), and (F) after slope to 110 MPa and (G), (H), and (I) after slope to 166 MPa. Cells were observed 1, 10, and 60 min after the end of the slopes. Bar scale = 5  $\mu\text{m}$ .

and B). Observations of superficial sections revealed that these invaginations presented a furrow-like aspect with a length of  $\sim 300 \text{ nm}$  (data not shown). This type of invaginations has already been described and localized within MCC patches [36]. After the shock to 110 MPa, cells showed an undulated plasma membrane with deeper invaginations than in control cells. These invaginations were narrower at the base than at the tip and extended about 150 nm into the cytosol (Fig. 5D). After the slope condition to 110 MPa, membrane deformation was different: the invaginations were fewer but were longer ( $\sim 400\text{--}500 \text{ nm}$ ) than in the case of the shock dehydration (Fig. 5E). They often appeared curl back toward, and in some cases even to fuse, with themselves or the cell surface (Fig. 5F).

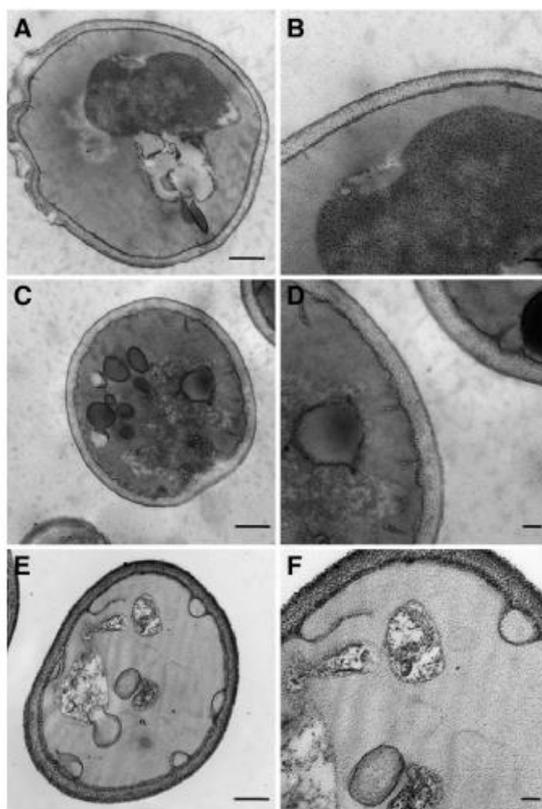
In contrast to the observations after dehydration in vegetal cells [38], the cell wall remained in contact with the plasma membrane after the dehydration treatment, and the classical plasmolysis event was not observed. This can be explained by the many anchorage sites between the cell wall and plasma membrane in yeast and by the greater elasticity of the wall of yeast cells than in vegetal cells [39].

#### 3.4. Progressive dehydration leads to lateral redistribution of Sur7-GFP

Effect of treatments to 166 MPa (progressive or rapid) on lateral distribution of Sur7-GFP was studied. In control cells, Sur7 proteins fused to GFP were not distributed homogeneously in the plasma membrane but were concentrated in discrete patches (Fig. 6A), as described previously [19,40]. Analysis of the fluorescence intensity profiles of the median optical sections gave an estimated mean number of patches at the median section of the control cells of 11 with a size of about 550 nm (Table 3). This number of patches is in agreement with previous observations [19], MCC size of 300 nm which is smaller than the size estimated in the present study has been reported [20]. This difference could result from the blur introduced by micro-

scopic imaging and from the threshold used to estimate the domain size. After hyperosmotic shock to 166 MPa, the repartition of Sur7-GFP domains remained in distinct patches (Fig. 6B). The distance between the fluorescence intensity peaks on the membrane perimeter was smaller than that in control cells, indicating that the Sur7-GFP patches were positioned closer to each other. The size of the domains was also slightly decreased. Progressive dehydration to 166 MPa changed the distribution of the Sur7 proteins, and the plasma membrane did not exhibit small fluorescent patches, but larger fluorescent domains (Fig. 6C) with a mean size of about 1.1  $\mu\text{m}$  (Table 3). The number of domains decreased from 11 in median cell sections of control cells and cells subjected to rapid dehydration (shock) to 6 distinct domains after progressive dehydration (slope). Progressive dehydration caused a redistribution of Sur7p from the patches, suggesting that lateral membrane reorganization occurred during this treatment. These results indicate that the dehydration kinetic influences the evolution of the repartition of Sur7p.

Effect of rehydration on Sur7p distribution was assessed by observation of cells after dehydration to 166 MPa followed by rehydration. Yeasts were treated according to a dehydration–rehydration cycle leading to low survival rate (shock–shock) or to a cycle conducting to high survival rate (slope–slope). After the shock–shock cycle, Sur7-GFP was localized in the cell cytosol and was not observed in the plasma membrane (Fig. 7A) and did not evolve with time (Fig. 7B). As Sur7p is a membrane protein, this aberrant localization could be explained by lysis of the cells during the shock rehydration. Just after the rehydration step of the slope–slope cycle, fluorescence of Sur7-GFP was observed in large and diffuse domains of the plasma membrane (Fig. 7C). Sur7-GFP regained the initial small patch distribution 90 min later (Fig. 7D) suggesting that MCC domain re-formation required time. These results show an influence of the rehydration kinetic on the structural evolution of the plasma membrane.



**Fig. 5.** Ultrastructure of yeast in the first moments after hyperosmotic treatments. TEM micrographs of representative yeast sections. Control cells (A and B), cells after shock to 110 MPa (C and D) and after slope to 110 MPa (E and F) were treated with Thiery reaction. Cells were fixed just after the hyperosmotic treatments. (A), (C), and (E): bar scale = 500 nm. (B), (D), and (F): bar scale = 100 nm.

### 3.5. Plasma membrane integrity is challenged both by dehydration and rehydration

The permeability of the plasma membrane of the yeast cell population was estimated with PI staining. The cells were labeled during, or 60 min after dehydration, and after rehydration in the high-osmotic pressure (166 MPa) condition in the slope and shock experiments (Fig. 8A). Dehydration led to permeabilization of some of the cells, and the proportion of cells affected was higher for shock (45.6%) than for slope (12.9%). The staining pattern was similar for staining performed during the perturbations and for staining performed 60 min after the maintenance period at 166 MPa. This result indicates that permeabilization occurred in the first minute of the treatments and persisted over the time. Shock rehydration, performed after 60 min maintenance, caused additional permeabilization of cells: proportion of permeabilized cells after rapid rehydration reached 86.4% and 55.2% for the dehydration achieved according to a shock or a slope, respectively (Fig. 8). These results suggest that the kinetics of dehydration and rehydration influence the membrane integrity of the plasma membrane. Thus, the two steps of the dehydration–rehydration cycle are critical for maintaining plasma membrane integrity.

## 4. Discussion

We have extended the findings of a previous study [16] on the impact of hyperosmotic stress on the plasma membrane by characterizing the structural and functional plasma membrane modifications following osmotic perturbations. We focused on the effects of the kinetic and the amplitude of hyperosmotic treatments on these alterations to understand the influence of these parameters on yeast survival. Several pieces of evidence are presented, which allow us to propose a scenario describing the events implied in survival and death of cells during hydric perturbations (Fig. 9).

### 4.1. Preservation of cell integrity and high survival rate after moderated dehydration (15 and 30 MPa)

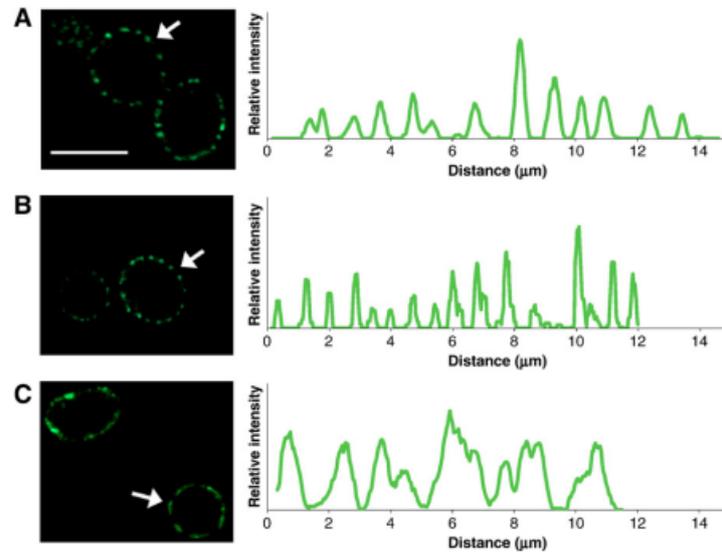
Hyperosmotic treatment to 30 MPa led to a high survival rate of yeast (Table 2), and progressive and rapid dehydration to this level conducted to the same viability. This suggests that survival after mild dehydration is not dependent on the kinetics of dehydration and rehydration. Cell viability was not affected by the duration of the maintenance at 30 MPa before rehydration (Fig. 1). Thus, this osmotic level, slightly higher than the one allowing osmoregulation [5], corresponds to a condition where the cell growth is stopped but where the viability remains high. This suggests that the plasma membrane integrity is preserved over the time in this condition. Fluorescent staining by FM 4-64 showed a smooth and regular aspect of the yeast plasma membrane after the perturbation to 30 MPa (Figs. 3 and 4), similar to that in the control cells (Fig. 3A), which did not change with exposure time. Preservation of membrane integrity could be related to the maintenance of lipid order in the liquid phase. Indeed, the lipid phase transition from the liquid-crystalline to gel phase, which can destabilize the plasma membrane, has been reported to occur above 60 MPa in glycerol solutions for *S. cerevisiae* [12].

Experiments performed at 15 and 30 MPa showed that mild dehydrations, to levels higher than the ones allowing yeast osmoregulation [5], conducted to the arrest of plasma membrane endocytosis mechanism (Figs. 2 and 3). This active mechanism is time, temperature and energy dependent [35]. In our study, endocytosis was observed even if the yeasts were placed in water–glycerol at 1.4 MPa (Fig. 2). This suggests that an energetic insufficiency cannot be the cause of the observed arrest of endocytosis. Arrest of endocytosis is most probably related to the consequences of the decrease of hydric potential on macromolecular structure assemblies. For example, hyperosmotic treatments are known to cause depolymerization of the yeast cytoskeleton [41,42] which is required for plasma membrane endocytosis [43,44].

### 4.2. Severe hyperosmotic shocks (110 and 166 MPa) lead to cell death

Yeast viability was strongly affected by rapid and severe dehydrations (Table 2). Leaking of cellular content induced by plasma membrane permeabilization is often reported to explain cell death during hydric perturbation [11,14]. Membrane continuity is essential for maintaining many vital cellular functions that rely on membrane-bound proteins and electrochemical potentials, such as ATP synthesis. The results of the membrane permeability experiments (Fig. 8B) and those on viability (Table 2) confirm this hypothesis because the proportion of permeabilized cells was similar to that of dead cells. Staining by PI at different moments of dehydration–rehydration cycles allowed us to specify the critical phases for plasma membrane integrity (Fig. 8) and to draw the probable scenario explaining cell death during hydric treatments. This scenario is composed of two phases presented in Fig. 9A.

First, a part of cells are irreversibly permeabilized during the rapid volume variation phase caused by the osmotic shock (Fig. 8B).



**Fig. 6.** Impact of dehydration kinetics to 166 MPa on Sur7-GFP domain repartition in the plasma membrane. (A) Control cells, (B) cells after rapid dehydration to 166 MPa, and (C) cells after progressive dehydration to 166 MPa. On the left of the figure, median optical sections through the cells are shown. On the right, representative fluorescence intensity profiles (diagrams) measured along the perimeter of the cells are shown. Each profile corresponds to the cell indicated by an arrow. A mean filter was applied on the plotted curves to reduce the noise present in the raw data, and the curves were normalized to the same maximum value. Bar scale = 5  $\mu\text{m}$ .

Membrane permeabilization could be related to the phase transitions of lipids emerging around 60 MPa [12]. Such phenomenon is induced by the removal of water from polar head groups during dehydration [11] and affects the resistance of membranes to shear forces [45]. Moreover, rapid volume contraction may be critical because plasma membrane regions with too high curvature could experience the loss of the continuity of the lipid bilayer.

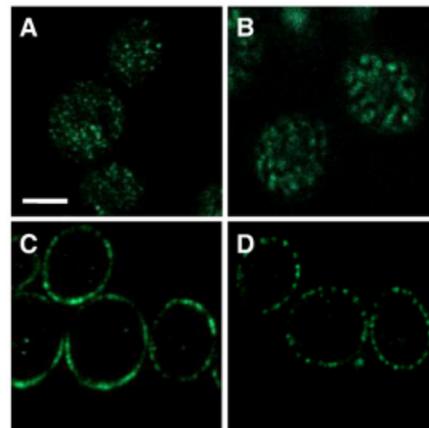
Rehydration step after maintenance period in hyperosmotic conditions is also critical for cell integrity. Maintenance period of 60 min followed by rapid rehydration conducted to an increase of the proportion of permeabilized cells (Fig. 8B). Higher survival rates were observed when the exposure times were brief (<15 min) (Fig. 1) suggesting that membrane integrity was preserved during rehydration for the short maintenance period in hyperosmotic conditions. Thus, permeabilization occurring during the rehydration phase is linked to events arising in the first minutes after the shock dehydration. During this period, progressive plasma membrane internalization was observed (Fig. 5). This phenomenon leads to reduction of the plasma membrane surface, which becomes insufficient during the rehydration step and leads to cell lysis when the cell volume increases (Fig. 9A). Plasma membrane rupture explains the abnormal intracellular location of Sur7-GFP observed after rapid rehydration (Fig. 7).

**Table 3**  
Impact of different dehydration kinetics to 166 MPa on the number and size of plasma membrane domain containing Sur7-GFP.

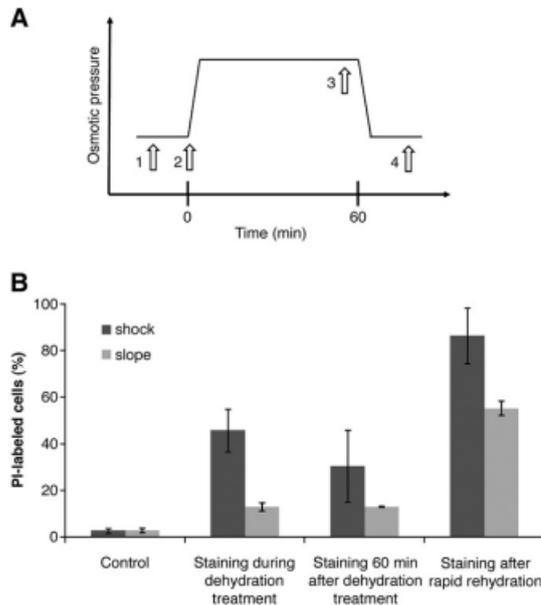
	Mean number (SD) of domains by cell section	Mean size of domain ( $\mu\text{m}$ )
Control 1.4 MPa	11.0 (0.6)	0.56 (0.05)
Shock 166 MPa	11.0 (1.6)	0.49 (0.015)
Slope 166 MPa	6.3 (0.8)	1.13 (0.24)

The mean number of domains was estimated by observation of median optical sections through the cells. The SDs were calculated from the observation of 20 cells for each treatment.

The relation between membrane internalization and cell death is supported by the higher survival rate after 110 MPa than 166 MPa which could be related to the absence or the insufficiency of membrane internalization for some cells at 110 MPa (Fig. 3G). Thus, plasma membrane internalization induced by hyperosmotic shock seems to be a key event in the induction of the cell death during the dehydration–rehydration cycle.



**Fig. 7.** Evolution of the repartition of Sur7-GFP after rehydration. (A) and (B) correspond to cells after shock to 166 MPa, kept during 60 min in hyperosmotic conditions followed by shock rehydration to 1.4 MPa. (C) and (D) correspond to cells after slope dehydration to 166 MPa, kept 60 min in hyperosmotic conditions followed by progressive rehydration to 1.4 MPa. Cells were observed just after rehydration (A and C) or 90 min after rehydration (B and D). Bar scale = 2  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 8.** Estimation of the integrity of yeast during dehydration–rehydration. (A) Protocol for cell staining with PI in order to investigate the evolution of membrane permeability during treatments. The arrows represent the timing of cell staining: 0 min corresponds to the beginning of the hyperosmotic treatment. PI was introduced (1) before, (2) during, (3) 60 min after the dehydration treatment, and (4) after the rehydration step. Rapid dehydration (shock) and progressive dehydration (slope) were performed. (B) The proportion of permeabilized cells (positively stained with PI) during and 60 min after 166 MPa dehydration treatment, and after rapid rehydration to 1.4 MPa. Error bars correspond to the SD calculated from three repeat experiments. At least 300 cells were observed for each experiment.

The cause of membrane internalization after severe hyperosmotic shock may be related to the rapid volume contraction of the cells. Due to the low lateral compressibility of the membrane [46], the cell  $s/v$  ratio increase conducted to the deformation of the plasma membrane [9,10]. After severe hyperosmotic shocks, the dissipation of membrane surface excess could be achieved by undulation and furrow-like invaginations of the plasma membrane. Furrow-like invaginations, localized at the MCC domains containing Sur7p [36], were also observed in our study in isotonic conditions (Fig. 5B) but they were shallower than after hyperosmotic shocks (Fig. 5D). A possible mechanism is the extension of membrane invaginations, existing in isotonic conditions, to dissipate the excess of membrane surface. This assumption is supported by the observation of the closeness of the Sur7-GFP patches after the shock dehydration (Table 3). Observation of Sur7-GFP localized in sterol-rich MCC microdomains revealed that these proteins were not internalized (Fig. 6B). Consequently, the phenomenon of membrane internalization could consist in a first initial step of furrow-like invagination extension by low sterol content membrane region. Membrane fusion is the second step necessary for membrane internalization. This event could be explained by the closeness between two portions of plasma membrane (Fig. 5D), protein aggregation [47] and the structural instability of lipids in hyperosmotic conditions which promote membrane fusion and vesicle formation [48,49].

#### 4.3. Progressive dehydrations and cell survival to severe treatments (110 and 166 MPa)

As already reported [13,22,23], progressive dehydrations allow higher survival rates than ones obtained after rapid treatments

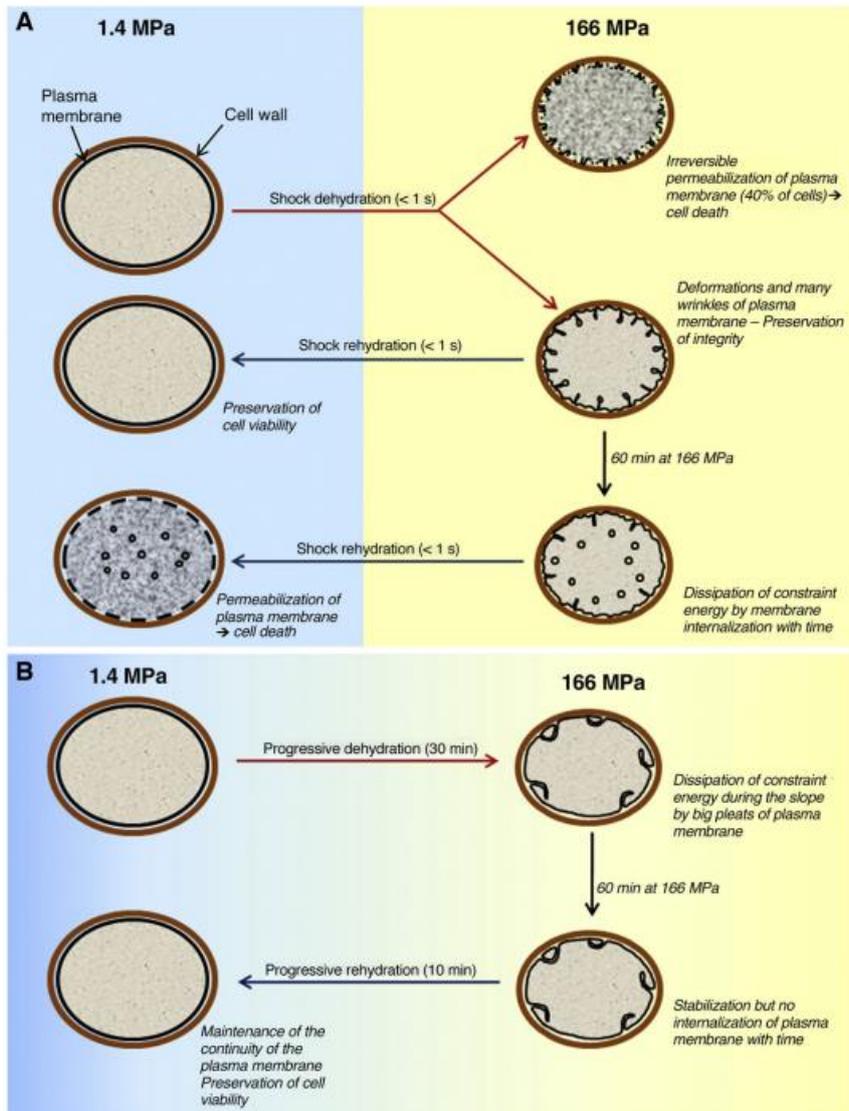
(Table 2). High cell survival rates are related to the preservation of plasma membrane integrity during the two steps of dehydration–rehydration cycle (Fig. 8). Preservation of membrane continuity may result from the particular evolution of membrane structure during progressive perturbations which consists in the formation of big pleats. Accordingly, membrane surface excess, caused by cell volume contraction, is dissipated in some fewer and larger pleats than in the case of shock dehydration (Fig. 5). Such deformations do not bring closer portions of plasma membrane which could explain the absence of membrane internalization over time after progressive treatments (Fig. 4).

The formation of these large invaginations which curled back toward the cell surface (Fig. 5E and F) could be related to the rate of increase of the  $s/v$  ratio. Indeed, such invaginations are sometimes observed when the chemical fixation of samples for electron microscopy causes slight osmotic dehydration. Similar formations are also observed on yeast mutants presenting an imbalance between exocytosis and endocytosis which is not compensated by a parallel increase in overall growth [50]. In this last case, the increase of the  $s/v$  ratio also occurs progressively. Formation of such invaginations could depend on the time required for the lateral reorganization of the plasma membrane. This hypothesis is comforted by the observation of the modification of Sur7-GFP repartition after the progressive dehydration (Fig. 6). Delocalization of proteins located in MCC domains after perturbation has been already reported: plasma membrane depolarization induces reversible dispersion of the  $H^+$ -symporters, localized in MCC domains in physiological conditions [19]. However, to our knowledge, the delocalization of Sur7p has never been observed. Sur7p is described as a very stable protein due to its association with large immobile protein assemblies at the cell cortex [51]. Observation of its redistribution could be linked to the severity of the perturbation used in the present study. Indeed, modification of Sur7p lateral distribution, after progressive dehydration to 166 MPa, could be related to thorough membrane reorganization caused by the disordered to ordered phase transition which occurs in this elevated range of osmotic pressures [12]. Such phenomenon is known to promote progressive phase separation in the membrane plane [52] and could influence the lateral distribution of proteins in the membrane due to their partition equilibrium between phases [53].

After progressive dehydration, invaginations formed during the perturbation could be reincorporated into the plasma membrane during rehydration, avoiding permeabilization for some of the cells during the increase in cell volume (Table 2). The survival rate of yeasts was even higher when rehydration was performed progressively, as already reported on bacteria [54]. Hypothetical events that may allow a high survival rate during severe dehydration followed by rehydration are presented in Fig. 9B. Progressive rehydration probably causes slow and optimal unfolding of membrane pleats which allows the maintenance of membrane integrity. This explains the beneficial effect on yeast survival of rehydration in the slope condition after dehydration to 166 MPa (Table 2). Therefore, after dehydration to high-osmotic pressures, the rehydration step should be considered as a second perturbation. After rehydration, the MCC domains visualized by Sur7-GFP did not immediately appear as small domains but recovered their patch distribution over time (Fig. 7). The time period after rehydration, allowing Sur7-GFP patch recovery, could correspond to the requisite time for the recovery of the cell metabolism after hydric perturbations which could be involved in rich Sur7p domain re-formation. However, this mechanism is not really understood and should be investigated further.

#### 5. Conclusion

The present study focused on yeast plasma membrane modifications and their dynamics during hyperosmotic perturbations. We found that the modifications varied according to the osmotic level and



**Fig. 9.** Schematic representations of the hypothetical sequence of events occurring during high-amplitude dehydration of yeast in the shock (A) or slope (B) conditions followed by rehydration. The first scheme (A) highlights the different mechanisms leading to cell death during the rapid dehydration and rehydration stages. Scheme B explains how the yeasts maintain their integrity during progressive dehydration followed by progressive rehydration.

the kinetic of treatment and could explain the survival and the death of cells during hydric perturbations. The study of plasma membrane behavior during drastic hydric perturbations showed that cell death is strongly related to loss of membrane integrity. A determinant mechanism causing the loss of membrane integrity during dehydration–rehydration cycle is a plasma membrane internalization which occurs after hyperosmotic shocks. We have shown for the first time that the morphologic response of the plasma membrane is related to the kinetic of dehydration, suggesting that this cellular structure is sensitive to the rate of environmental perturbation. By visualizing the dynamics of the membrane microdomains during environmental

perturbation, we have shown that lateral membrane reorganization can occur during hydric disturbance and that this organization is time dependent. This suggests that the plasticity of the plasma membrane is a key property in the resistance of cells to environmental stresses. Such knowledge may lead to improvement of cell resistance during hydric stress and to optimization of preservation methods based on dehydration (drying, freezing, and freeze-drying). Indeed, the both steps of the dehydration–rehydration cycle need to be considered as critical for membrane integrity and cell survival. Future studies will focus on the mechanisms of plasma membrane lateral reorganization during drastic environmental perturbation and the potential effects of

lipid structural transitions and changes in functionality of active proteins on the membrane microdomain distribution.

### Acknowledgements

We are grateful to W. Tanner and G. Grossmann (University of Regensburg, Cell Biology and Plant Physiology, Regensburg, Germany) for providing the plasmid Ylp211SUR7GFP. We thank the personnel of the Plateau Technique "Imagerie Spectroscopique" IFR 92 (University of Burgundy, Dijon, France) for the technical support during the confocal microscopy manipulations. The authors wish to thank the INRA/University of Burgundy microscopy center of Dijon for the assistance during electron microscopy manipulations. This work was supported by the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy.

### References

- [1] K.L. Scott, J. Lecak, J.P. Acker, Biopreservation of red blood cells: past, present, and future, *Transfus. Med. Rev.* 19 (2005) 127–142.
- [2] X.C. Meng, C. Stanton, G.F. Fitzgerald, C. Daly, R.P. Ross, Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures, *Food Chem.* 106 (2008) 1406–1416.
- [3] C.A. Morgan, N. Herman, P.A. White, G. Vesey, Preservation of micro-organisms by drying: a review, *J. Microbiol. Methods* 66 (2006) 183–193.
- [4] E. Klipp, B. Nordlander, R. Kruger, P. Gennemark, S. Hohmann, Integrative model of the response of yeast to osmotic shock, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 975–982.
- [5] P.A. Marechal, I.M. de Maranon, P. Molin, P. Gervais, Yeast cell responses to water potential variations, *Int. J. Food Microbiol.* 28 (1995) 277–287.
- [6] S.J. Prestrelski, N. Tedeschi, T. Arakawa, J.F. Carpenter, Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers, *Biophys. J.* 65 (1993) 661–671.
- [7] B. van den Berg, R.J. Ellis, C.M. Dobson, Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation, *EMBO J.* 18 (1999) 6927–6933.
- [8] P. Gervais, L. Beney, Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell. Mol. Biol.* 47 (2001) 831–839.
- [9] A.K. Adya, E. Canetta, G.M. Walker, Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 120–128.
- [10] F. Guilak, G.R. Erickson, H.P. Ting-Beall, The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes, *Biophys. J.* 82 (2002) 720–727.
- [11] J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 520–523.
- [12] C. Laroche, L. Beney, P.A. Marechal, P. Gervais, The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 249–254.
- [13] V. Ragoonanan, J. Malsam, D.R. Bond, A. Aksan, Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 2283–2290.
- [14] M.J. Beker, A.I. Rapoport, Conservation of yeasts by dehydration, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 35 (1987) 127–171.
- [15] A.J. Rapoport, G.M. Khroustalyova, E.N. Kuklina, Anhydrobiosis in yeast: activation effect, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30 (1997) 9–13.
- [16] H. Simonin, L. Beney, P. Gervais, Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1600–1610.
- [17] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [18] F.R. Maxfield, Plasma membrane microdomains, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 483–487.
- [19] G. Grossmann, M. Opekarova, J. Malinsky, I. Weig-Meckl, W. Tanner, Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast, *EMBO J.* 26 (2007) 1–8.
- [20] K. Malinska, J. Malinsky, M. Opekarova, W. Tanner, Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 4427–4436.
- [21] G. Grossmann, J. Malinsky, W. Stahlschmidt, M. Loibl, I. Weig-Meckl, W.B. Frommer, M. Opekarova, W. Tanner, Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast, *J. Cell Biol.* 183 (2008) 1075–1088.
- [22] P. Mary, D. Ochin, R. Tailliez, Rates of drying and survival of *Rhizobium meliloti* strains during storage at different relative humidities, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 207–211.
- [23] L. Beney, I. Martinez de Maranon, P.A. Marechal, P. Gervais, Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Food Microbiol.* 55 (2000) 275–279.
- [24] Y. Mille, J.P. Obert, L. Beney, P. Gervais, New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium, *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004) 71–76.
- [25] C. Schlee, M. Miedl, K.A. Leiper, G.G. Stewart, The potential of confocal imaging for measuring physiological changes in Brewer's yeast, *J. Inst. Brew.* 112 (2006) 134–147.
- [26] J.C. Anand, A.D. Brown, Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol, *J. Gen. Microbiol.* 52 (1968) 205–212.
- [27] H. Ito, Y. Fukada, K. Murata, A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* (1983) 163–168.
- [28] R.S. Norrish, An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups, *Int. J. Food Sci. Technol.* 1 (1966) 25–39.
- [29] J. Chirife, C.F. Fontan, A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range, *J. Food Sci.* 45 (1980) 1717–1719.
- [30] Y. Gachet, J.S. Hyams, Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4231–4242.
- [31] T. Meckel, A.C. Hurst, G. Thiel, U. Homann, Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K-channel KAT1, *Plant J.* 39 (2004) 182–193.
- [32] T.A. Vida, S.D. Emr, A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast, *J. Cell Biol.* 128 (1995) 779–792.
- [33] J.P. Thiery, Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique, *J. Microsc.* 6 (1967) 987–1018.
- [34] D. Otsuga, B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, J.M. Shaw, The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 333–349.
- [35] H. Riezman, Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis, *Cell* 40 (1985) 1001–1009.
- [36] V. Stradalova, W. Stahlschmidt, G. Grossmann, M. Blazikova, R. Rachel, W. Tanner, J. Malinsky, Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 2887–2894.
- [37] Q. Bone, E.J. Denton, The osmotic effects of electron microscope fixatives, *J. Cell Biol.* 49 (1971) 571–581.
- [38] M. Ferrando, W.E.L. Spiess, Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001) 115–127.
- [39] G.J. Morris, L. Winters, G.E. Coulson, K.J. Clarke, Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 2023–2034.
- [40] M.E. Young, T.S. Karpova, B. Brugger, D.M. Moschenross, G.K. Wang, R. Schneiter, F.T. Wieland, J.A. Cooper, The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 927–934.
- [41] A.M. Robertson, I.M. Hagan, Stress-regulated kinase pathways in the recovery of tip growth and microtubule dynamics following osmotic stress in *S. pombe*, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 4055–4068.
- [42] I. Slaninova, S. Sestak, A. Svoboda, V. Farkas, Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Microbiol.* 173 (2000) 245–252.
- [43] K.R. Ayscough, J. Stryker, N. Pokala, M. Sanders, P. Crews, D.G. Drubin, High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 399–416.
- [44] D. Pruyne, A. Bretscher, Polarization of cell growth in yeast, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4) (2000) 571–585.
- [45] S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz, Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy, *Biophys. J.* 89 (2005) 4261–4274.
- [46] E.A. Evans, R. Waugh, L. Melnik, Elastic area compressibility modulus of red cell membrane, *Biophys. J.* 16 (1976) 585–595.
- [47] K. Goyal, L.J. Walton, A. Tunnacliffe, LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress, *Biochem. J.* 388 (2005) 151–157.
- [48] J. Liu, M. Kaksonen, D.G. Drubin, G. Oster, Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 10277–10282.
- [49] A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, B. Goud, Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules, *EMBO J.* 24 (2005) 1537–1545.
- [50] B. Singer-Kruger, Y. Nemoto, L. Daniell, S. Ferro-Novick, P. De Camilli, Synaptotagmin family members are implicated in endocytic membrane traffic in yeast, *J. Cell Sci.* 111 (1998) 3347–3356.
- [51] T.C. Walther, J.H. Brickner, P.S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja, P. Walter, Eisosomes mark static sites of endocytosis, *Nature* 439 (2006) 998–1003.
- [52] K. Jorgensen, O.G. Mouritsen, Phase-separation dynamics and lateral organization of 2-component lipid-membranes, *Biophys. J.* 69 (1995) 942–954.
- [53] T. Baumgart, A.T. Hammond, P. Sengupta, S.T. Hess, D.A. Holowka, B.A. Baird, W.W. Webb, Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 3165–3170.
- [54] Y. Mille, L. Beney, P. Gervais, Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 578–582.



## ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND?

Sebastien Dupont,<sup>1</sup> Guillaume Lemetais,<sup>1</sup> Thierry Ferreira,<sup>3</sup> Philippe Cayot,<sup>1</sup> Patrick Gervais,<sup>1</sup> and Laurent Beney<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup>E-mail: laurent.beney@u-bourgogne.fr

<sup>3</sup>Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, UMR-CNRS 6187, 1, rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France

Received November 29, 2011

Accepted March 21, 2012

Data Archived: Dryad database: doi:10.5061/dryad.pd28pm7n

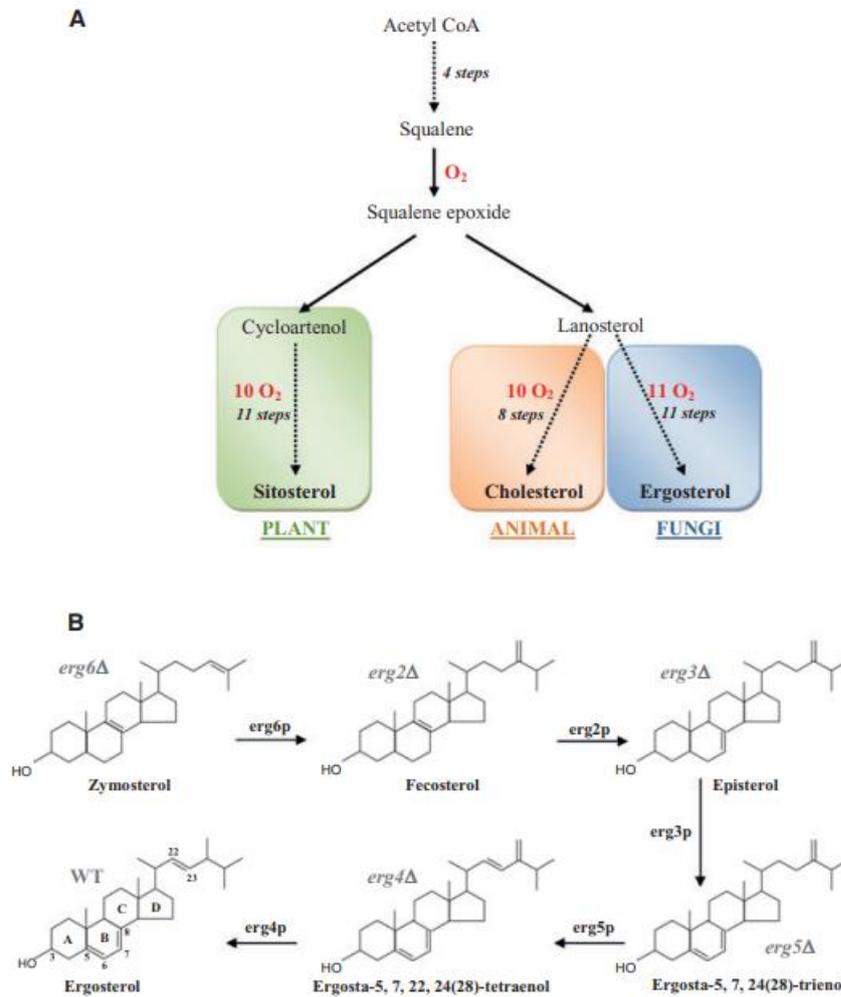
Sterols, essential lipids of most eukaryotic cells, ensure important structural and signaling functions. The selection pressure that has led to different dominant sterols in the three eukaryotic kingdoms remains unknown. Here, we investigated the influence of the progression in the different steps of the ergosterol biosynthetic pathway (EBP) on the yeast resistance to transitions from aqueous to aerial media, typical perturbations of the higher fungi habitats. Five mutants of the EBP (*ergΔ*), accumulating different sterol intermediates in the EBP, and the wild-type (WT) strain were exposed to drying under atmospheric air or nitrogen and wetting. Results show that the progression in the EBP parallels an increase in the yeast resistance to air-drying with a maximal survival rate for the WT strain. When drying/wetting was performed under nitrogen, yeast survival was higher, particularly for the earlier mutants of the EBP. Thus, ergosterol, through its protective role against mechanical and oxidative stress, might have been selected by the pressure induced by drying/wetting cycles occurring in the fungi habitats. These results support the Bloch hypothesis, which postulates that the properties of sterols are gradually optimized for function along the biosynthetic pathway and provide a response to the enduring question "why ergosterol in fungi?".

**KEY WORDS:** Dehydration, ergosterol pathway, evolution, oxidation, sterols, yeast.

Plasma membrane of eukaryotes contains sterols that are essential for the organization and functions of this structure. The main sterols found in eukaryotes are represented by three predominant forms: cholesterol in vertebrates, phytosterols (sitosterol, stigmasterol, campesterol) in plants, and ergosterol in fungi. Each of these sterols is the end-product of a long multistep biosynthetic pathway that derives from a common initial pathway (acetyl CoA to squalene epoxide) (Fig. 1A). These three different pathways may, as proposed by Konrad Bloch, parallel sterol structural evolution and the product of each step should support optimized cellular and physiological functions when compared with its precursors (Bloch 1983). For example, Bloch argued that cholesterol,

in its own synthetic pathway, represents evolutionary perfection, in terms of functional fitness as a membrane reinforcer of animal cells.

The specificity of sterols, in each eukaryotic life kingdom, may be related to biological evolution but the origin of the three distinct pathways after the common early steps (Fig. 1A) is an intriguing fact that still remains unclear. In particular, the reason why ergosterol is present in fungi is not clear, because its synthesis requires more energy than cholesterol (Parks and Casey 1995) and structure-function studies have failed to show any advantages of ergosterol compared with cholesterol (Parks and Casey 1995; Shrivastava and Chattopadhyay 2007). So, it is thought that



**Figure 1.** Sterol biosynthesis pathways. (A) Simplified generalized synthetic pathway of sterols in plants, animals, and fungi. The three kingdoms have a common early synthetic pathway to squalene epoxide. After this compound, cycloartenol is produced in plants whereas squalene epoxide gives lanosterol in animals and fungi. The end-products of the sterol pathways are sitosterol, cholesterol, and ergosterol for plants, animals, and fungi, respectively. The number of oxygen molecules required for the different pathways is indicated in red. The number of steps involved in the pathways is indicated in italics (Galea and Brown 2009). (B) The last five steps of the ergosterol biosynthetic pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Structures of the main sterols accumulated by the *erg*Δ mutants and the WT are shown.

ergosterol is preferred because it serves as a consensus sterol, being able to satisfy a variety of unidentified functions (Parks et al. 1999). A recent work also showed that some less evolutionary advanced species of fungi do not synthesize ergosterol but cholesterol (Weete et al. 2010). Therefore, ergosterol biosynthetic pathway (EBP) might have accompanied the evolution of the fungi kingdom.

An extensive literature reports the fundamental contribution of sterols to fluidity, permeability, microdomain formation, protein functionality and membrane activities (Jacobson et al. 2007; Guan et al. 2009; Tyler et al. 2009; Lingwood and Simons 2010). These crucial roles of sterols in cell membrane impose to eukaryotic organisms, that are unable to produce sterols, to keep them from food (Bos et al. 1976; Odriozola et al. 1978). In

addition to the structural advantage, it was proposed that evolution of sterol synthetic pathways could be linked to oxygenation of Earth (between 2.7 and 2.4 Gy) (Summons et al. 2006), highlighting the possible role of sterol evolution in the management of oxidative stress (Galea and Brown 2009; Brown and Galea 2010). Therefore, the origin of the EBP could be related to some fungi's life specificities that could have constituted the main selection pressure that drove the biochemical evolution of this synthetic pathway.

Terrestrial fungi are interfacial organisms that live in soil, on the surfaces of rocks and of living organisms (plants, animals) where they experience frequent fluctuations of relative humidity (RH). These organisms are particularly well adapted to these habitats where their presence is frequently associated with detrimental effects such as mycosis. Climatic instabilities, occurring in the habitats of terrestrial fungi, are at the origin of drying and wetting phenomena that impose on cell transitions from aqueous to aerial conditions. The main problem for these fungi exposed to drying/wetting cycles is related to their inability to maintain water homeostasis. Consequently, such perturbations induce both severe osmotic stress and direct exposure to air. Because ergosterol is known to increase the mechanical resistance of cell plasma membrane to osmotic treatments when compared to its biochemical precursors (Dupont et al. 2011) and to be involved in the resistance of membrane lipids to peroxidation (Wiseman 1993), we hypothesized that the EBP may have been selected under the pressure of the mechanical and oxidative constraints caused by transitions between wet and dry conditions.

In the present work, we investigated the influence of the progression in the EBP on the yeast resistance to transitions from aqueous to aerial media. Most *ERG* genes are essential but the five last proteins involved in the EBP are encoded by nonessential *ERG* genes (Lees et al. 1995; Munn et al. 1999). The five viable *Saccharomyces cerevisiae* mutants of the EBP (*ergΔ*) and the wild-type (WT) strain were exposed to drying under atmospheric air or nitrogen and wetting. Results show an unambiguous relationship between the progression in the pathway from ergosterol precursors toward ergosterol and the ability of yeast to survive air-drying and wetting.

## Materials and methods

### YEAST STRAINS AND GROWTH CONDITIONS

The WT and *ergΔ* strains of *S. cerevisiae* BY4742 (Euroscarf, Frankfurt, Germany) used in this study are presented in Table 1. Cells were grown aerobically at 25°C in 250 mL conical flasks containing 100 mL of Malt Wickerham (MW) modified medium. This contained 10 g glucose, 3 g pancreatic peptone, 3 g yeast extract, 1.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in 1 L of water-glycerol, and had an osmotic pressure

of 1.4 MPa ( $a_w = 0.99$ ). This osmotic pressure has been recommended for the optimal growth of *S. cerevisiae*. For aerobic growth, a subculture (1 mL) was transferred into a conical flask containing MW medium, and the cultures were placed on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NY) at 250 rpm for 24 h and allowed to grow to the early stationary phase. The final population was nearly 10<sup>8</sup> cells/mL.

To perform ergosterol supplementation under anaerobic conditions, the MW medium used was supplemented with 2% (v/v) Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) and 250 μM ergosterol and was degassed of oxygen by nitrogen bubbling for 12 h before inoculation with 1 mL of subculture. The culture was cultured in an anaerobic chamber for 24 h at 25°C.

### ENVIRONMENTAL CONTROL CHAMBER

The environmental control chamber consisted of an airtight plastic box controlled for RH. Saturated saline solution was used to control the average RH inside the box (Greenspan 1977). The nature of the gas in the chamber was controlled by a system allowing the filling of the chamber with atmospheric air or with nitrogen (N<sub>2</sub>). Samples were placed on a rack above the salt solution and the area of exposure was kept as large as possible to allow free diffusion of water. The chambers were maintained at a temperature of 25°C and ventilated to increase mass transfer. NaCl saturated salt solution allowed the RH in the chamber to reach 75% and dry samples to achieve a water activity of 0.75. Saturation was assured by mixing a large excess (50%) of each salt with deionized water. Culture samples (40 mL) were centrifuged for 5 min at 2200 × g, washed twice with physiological water, and the pellets resuspended in 10 mL of physiological water. Cultures were harvested by filtration using a Buchner funnel. A thin layer of yeast was then deposited on a glass microscope slide and placed in the drying chambers for 1 h. Rehydration was performed by plunging yeast cells directly into physiological water.

### MEASUREMENT OF YEAST VIABILITY

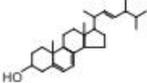
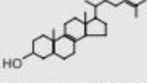
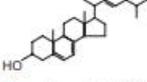
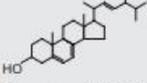
Yeast viability was estimated in triplicate using the colony forming unit (CFU) method. After drying followed by rehydration, cells were serially diluted and the appropriate dilutions were plated on MW solid medium (15 g/L of agar). CFU were counted after incubation for 48 h at 25°C and estimated as CFU/mL/g of hydrated paste. Cell suspensions and rehydration solutions were kept in an air-conditioned room at 25°C. Either in liquid medium or during air-drying desiccation, the  $a_w$  values of the solutions and the samples were checked with a dew-point osmometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA).

### STEROL IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION

Lipid extraction was performed as described previously (Pineau et al. 2009). The different sterol species were then separated by

## BRIEF COMMUNICATION

**Table 1.** Impact of the sterol composition of the WT and *erg6Δ* strains on the viability after drying under ambient air followed by rehydration.

		Chemical structures of the most abundant sterols <sup>1</sup>	Survival <sup>2</sup> after drying under ambient air ( $a_w = 0.75$ )
Aerobic culture	Wild type	 Ergosterol: 70.1% (4.3)	65.9% (2.2)
Aerobic culture	<i>erg6Δ</i>	 Zymosterol: 62.2% (4.0)	2.7% (0.5)
Anaerobic culture, ergosterol supplementation	Wild type	 Ergosterol: 90.0% (2.6)	83.0% (2.6)
Anaerobic culture, ergosterol supplementation	<i>erg6Δ</i>	 Ergosterol: 92.4% (3.2)	78.1% (4.4)

<sup>1</sup>Sterol identification and quantification were performed by gas chromatography. Standard deviations were calculated from three repeated experiments.

<sup>2</sup>Viabilities were measured with CFU method after rehydration. Standard deviations were calculated from at least three repeated experiments.

gas chromatography using a 25 m × 0.32 mm AT-1 capillary column (Alltech, Deerfield, IL). Instrument conditions were as follows: injection port temperature, 250°C; detector temperature, 250°C; initial oven temperature, 50°C. The oven temperature was increased at 30°C/min up to a temperature of 220°C followed by a 2°C/min increase to a final temperature of 290°C and held for 15 min. Sterols were identified by means of their retention times relative to cholesterol, used as a standard.

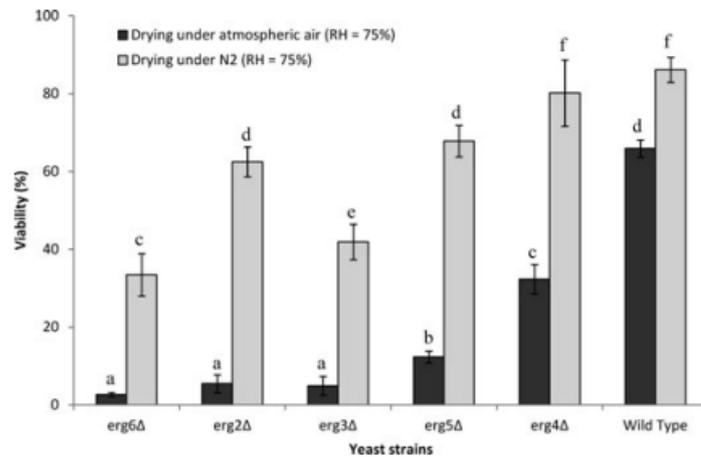
## Results

To estimate the influence of the progression in the EBP on the yeast resistance to transitions from aqueous to aerial media, five mutants of the EBP (*ergΔ*) and the WT strain were exposed to drying and wetting by introducing a thin layer of hydrated cells into a chamber containing atmospheric air or nitrogen with a controlled RH of 75%, corresponding to the typical RH of the gaseous phase measured over brine at 25°C. The mutant strains have deletions in the genes *erg6*, *erg2*, *erg3*, *erg5*, or *erg4* of the EBP. These mutants are well characterized and are unable to produce ergosterol (Zweytick et al. 2000; Heese-Peck et al.

2002; Souza et al. 2011). Each mutant accumulates mainly distinct sterols that differ from ergosterol in the number and the position of double bonds in the B-ring and in the side chain of the sterol molecule (Fig. 1B).

The survival of the different strains according to the nature of the gas in the drying chamber was measured (Fig. 2). Resistance of the yeast to drying in 75% RH atmospheric air increased with the extent of progression of the EBP. The mutants in the three earliest components of the pathway, that is, *erg6Δ*, *erg2Δ*, and *erg3Δ*, demonstrated low survival rates that did not exceed 6%. A significant progressive increase in the survival rate was observed for the strains with mutations in the three later genes, that is, *erg5Δ*, *erg4Δ*, and the WT, to 12%, 32%, and 66%, respectively. These results demonstrate that progression to the last three steps of the ergosterol synthetic pathway increased the ability of yeast to resist drying under atmospheric air.

The same drying protocol was performed replacing air with nitrogen (RH = 75%). This replacement induced a significant increase in survival rates for all the tested strains. Indeed, after drying under nitrogen, the viability of the three strains with mutations in the earliest *ergΔ* genes, *erg6Δ*, *erg2Δ*, and *erg3Δ*, reached 33%, 62%, and 42%, respectively (Fig. 2). The positive



**Figure 2.** Survival of the *ergΔ* and WT strains of *Saccharomyces cerevisiae* after drying followed by rehydration. Drying to an RH of 75% was performed under atmospheric air (dark-gray histograms) or under nitrogen (light-gray histograms). The different yeast strains are arranged along the x-axis according to the order of their mutations in the ergosterol biosynthetic pathway. Data are presented as mean values  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. Newman-Keuls pairwise comparisons were used for post-hoc statistical analysis; different letters within this figure indicate that means are significantly different ( $P < 0.05$ ).

effect of substitution of nitrogen for air was also observed with the *erg5Δ*, *erg4Δ*, and WT strains, with increases in survival rates to 68%, 80%, and 86%, respectively. These results suggest that the presence of oxygen in the gaseous phase decreases the resistance of yeast to drying. However, the yeast resistance to nitrogen drying did not occur gradually with the progression in the EBP, as observed in the case of atmospheric air drying. Indeed, the *erg2Δ* strain presented a better survival rate than *erg3Δ*. Thus, the gradual biochemical evolution of sterols in the EBP allows yeast to better accommodate to the presence of oxygen during drying. This last point is illustrated by the survival gain factor (survival rate under nitrogen/survival rate under air), which decreases from nearly 10 for *erg6Δ*, *erg2Δ*, and *erg3Δ*, to 5.5 for *erg5Δ*, 2.5 for *erg4Δ*, and 1.3 for WT.

To confirm that ergosterol is a key membrane component in the resistance to air-drying, ergosterol supplementation of a sensitive strain (*erg6Δ*) was performed before the drying treatment. Under aerobic growth conditions, yeast cells synthesize sterols and do not incorporate significant amounts of exogenous sterols, a phenomenon known as “aerobic sterol exclusion” (Lorenz and Parks 1991). Ergosterol supplementation was achieved by growing the cell in the absence of oxygen. The WT yeasts were also supplemented to verify that exogenous ergosterol had the same effect as endogenous ergosterol on yeast resistance to drying. The sterols of the *erg6Δ* and WT strains were analyzed according to the growth conditions, that is, aerobic or anaerobic with ergosterol supplementation. For each condition, the results of the chemical analysis are presented with the survival rates after drying (Table 2). After aerobic culture, ergosterol represented 70%

**Table 2.** Yeast strains used in this study.

Strains	Genotypes
Wild type	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0
<i>erg6Δ</i>	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YML008c::kanMX4
<i>erg2Δ</i>	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR202w::kanMX4
<i>erg3Δ</i>	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YLR056w::kanMX4
<i>erg5Δ</i>	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR015c::kanMX4
<i>erg4Δ</i>	(Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGL012w::kanMX4

of the total sterols in the WT strain; yeast with this proportion of ergosterol had a survival of 66% after air-drying to RH = 75%. In the same culture conditions, the *erg6Δ* strain mainly accumulated zymosterol (62% of total sterols) and survival associated with this sterol composition was low, close to 3%. Anaerobic growth with ergosterol supplementation of the two strains resulted in the accumulation of nearly 90% ergosterol and in survival rates close to 80% (Table 2). Thus, growth conditions under which ergosterol was the main accumulated sterol (aerobic and anaerobic for the WT strain, anaerobic for the *erg6Δ* strain) were associated with yeast resistance to air-drying. These results show that the ability of yeast to survive drying is directly linked to the accumulation of ergosterol.

## Discussion

The results of this study demonstrate for the first time the key role of the synthesis of ergosterol in the resistance of yeasts to drying/wetting treatments (Fig. 2). Replacement of zymosterol, the earliest sterol of the EBP that was tested in this study (*erg6*Δ strain), by ergosterol allowed the restoration of resistance to the level observed with the WT strain (Table 2). The main chemical transformations that occur during the biosynthetic process from zymosterol to ergosterol are a change in the saturation of the B-ring and of the aliphatic tail (Fig. 1B). These gradual modifications could contribute to optimization of the biophysical properties of the molecules at succeeding steps along the EBP and could explain the increase in resistance to drying/wetting cycles. Our results show that the three earliest mutants tested (*erg6*Δ, *erg2*Δ, and *erg3*Δ) are highly sensitive to drying/wetting. The first break in the increase of resistance along the EBP was detected with the *erg5*Δ strain. This progressively increased with *erg4*Δ to reach a maximal value with the WT strain (Fig. 2). The chemical structures of the principal sterols accumulated by these last three strains are characterized by the presence of two double bonds in the B-ring (Fig. 1B). During a radical attack, these conjugated double bonds allow the stabilization of sterol radicals by resonance (delocalization of the unpaired electron). This chemical characteristic could explain the beneficial effect on survival to drying/wetting, which involves oxidation (Garre et al. 2010), by protecting phospholipids against peroxidation in the same way as vitamin E (Packer 1991). The main sterols accumulated by the three strains with mutations early in the EBP possess a unique double C–C bond at the C-7,8 or C-8,9 position, far from the hydroxyl group, which does not promote the stabilization of the radical by resonance. This could explain the high sensitivity of the *erg6*Δ, *erg2*Δ, and *erg3*Δ strains to drying under atmospheric air. The progressive increase in resistance toward the end of the EBP (Fig. 2), observed with the *erg5*Δ, *erg4*Δ, and WT strains, might be related to the difference between the aliphatic tails of the sterols (Fig. 1B). Indeed, the tail structure affects the planarity of the sterols, which is a determinant of their position in the membrane (Xu and London 2000; Bakht and London 2006). Thus, the final steps of the ergosterol pathway might allow improved fitting of the sterol in the membrane, modifying parameters such as their depth within the lipid bilayer, to optimize the protection of phospholipids from oxidation. The sterol-mediated protection of lipids against oxidation has already been shown on model membranes (Wiseman 1993) but has never been demonstrated on biological cells. Our results show, for the first time, a relationship between the nature of the sterols and the resistance to oxidation. They also support a hypothesis which proposed that sterols may have given cells resistance to oxidation when oxygen levels rose during the Earth oxygenation (Galea and Brown 2009; Brown and Galea 2010). Indeed, the authors of this study conclude that the synthe-

sis of sterols, an oxygen-dependent process (Fig. 1A), could have been an adaptive response to the rise in terrestrial oxygen.

Drying experiments performed under nitrogen led to higher survival rates than air-drying experiments for all tested strains (Fig. 2). The effect of oxygen absence during drying was strong for the strains with mutations in early components of the EBP, decreased for those with mutations in later components of the EBP, and was minor for the WT strain. These results show that oxidation plays a major role in the lethal effect of drying under atmospheric conditions. However, as the death rate remained substantial for *erg6*Δ, *erg2*Δ, *erg3*Δ, and *erg5*Δ when drying was performed under nitrogen, we conclude that factors other than oxidation contribute to the cell death during drying. One of these factors could be severe mechanical constraints on the plasma membrane resulting from water loss from cells by osmotic transfer (Dupont et al. 2010). Indeed, the nature of sterols is known to influence plasma membrane properties such as fluidity (Abe and Hiraki 2009) and types of deformation (Bacia et al. 2005; Dupont et al. 2011). These modifications of membrane properties led to plasma membrane rupture and cell death during hyperosmotic stress in the *erg6*Δ strain but not the WT (Dupont et al. 2011). The relationship between the nature of the predominant sterol and the membrane properties is based on the structure of the sterol molecule, including its planar structure, size, and properties of its small polar 3–OH group (Xu and London 2000). In particular, the C–7,8 double bond of the sterol B-ring, only present in the *erg5*Δ, *erg4*Δ, and WT strains (Fig. 1B), is known to be involved in the packing and the overall rigidity of the plasma membrane (Xu and London 2000; Bakht and London 2006). Thus, the evolution of the chemical structure of sterols in the EBP could both improve the antioxidant and mechanical stabilizer roles of these molecules in the plasma membrane and explain the progressive increase along the EBP of the resistance of yeast strains to drying/wetting.

Under classical laboratory conditions, the nature of sterols has no effect on yeast growth. Indeed, the WT and *erg*Δ strains grew with the same kinetics on full media (data not shown). Accumulation of other sterols (cholesterol, desmosterol, or campesterol) by yeasts, induced by genetic transformation, does not affect cell growth (Souza et al. 2011). Thus, the nature of sterols is crucial for cells under stress conditions. The fact that progression down the EBP increases yeast resistance to drying/wetting events establishes a potential link between this pathway and the ability of fungi to survive in interfacial habitats. This result has important implications for the Bloch hypothesis, which is based on the observation that sterol pathways parallel sterol evolution and that the product of each step should better support cellular and physiological functions than its precursors (Bloch 1983). However, this hypothesis, which has mainly been tested for the structural function of sterols, has never been supported by experimental facts. For example, in the cholesterol pathway, it has been

shown that some precursors are more efficient than cholesterol for raft stabilization in a model membrane (Bakht and London 2006). The involvement of ergosterol in yeast resistance to drying/wetting events could be at the origin of the evolution of the EBP and of the widespread presence of ergosterol in land fungi (Weete et al. 2010). Indeed, the evolution of the chemical structure of sterols in the EBP could have both improved the antioxidant and mechanical stabilizer roles of these molecules in the plasma membrane and explain the progressive increase along the EBP of the resistance of yeast strains to drying/wetting. This study, performed in a cellular context, provides the first experimental data supporting the Bloch hypothesis.

In spite of the major role that ergosterol seems to play in the persistence of yeasts in their natural environment, Weete et al., who addressed the question of diversity of sterols in fungi, showed that ergosterol is not the only sterol in this kingdom (Weete et al. 2010). The findings of this study support the idea that cholesterol may be considered the most primitive fungal sterol, and that the evolution of the specific structure of ergosterol was driven by functional requirements specific to evolving fungi. Indeed, the primitive fungi that accumulate cholesterol are flagellated and live in an aquatic medium (James et al. 2006; Weete et al. 2010) where hydration is maximal and stable. This is consistent with the fact that cholesterol is an efficient mechanical stabilizer (Bakht and London 2006); although it is less effective as an antioxidant than ergosterol (Wiseman 1993) (cholesterol possesses only one double bond in the B-ring), it is less energetically expensive to produce (Parks and Casey 1995). These data, brought together with the results of the present study, could mean that the synthesis of ergosterol confers an important advantage for higher fungi survival and the colonization of the solid–air interfacial habitats.

We conclude that survival of drying and wetting is facilitated in yeast, a unicellular eukaryote unable to maintain water homeostasis, by ergosterol. This essential component, specific to the membranes of fungi, increases the resistance to mechanical constraints and oxidation caused by water evaporation and direct exposure to atmospheric air. Therefore, evolution of the EBP may have been a key element in the conquest of solid–air interfacial habitats by fungi. The results of this study suggest a response to the enduring question “why ergosterol in fungi?” (Parks and Casey 1995). The mechanisms related to these findings should be deepened in future experiments. For this purpose, we are currently studying the molecular properties of ergosterol in the plasma membrane to elucidate the mechanisms by which ergosterol preserves the membrane from chemical and physical alterations caused by air-drying and wetting. The expected applications include the optimization of drying-based methods for preservation of eukaryotic cells and the development of novel strategies for the destruction of fungi involved in many pathogenic and food spoilage activities.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy. We also thank K. O'Brien for the technical help and C. Iaconelli for expertise in statistical analysis.

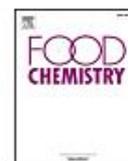
#### LITERATURE CITED

- Abe, F., and T. Hiraki. 2009. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:743–752.
- Bacia, K., P. Schwille, and T. Kurzchalia. 2005. Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3272–3277.
- Bakht, O., and E. London. 2006. Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *J. Biol. Chem.* 281:21903–21913.
- Bloch, K. E. 1983. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14:47–92.
- Bos, M., B. Burnet, R. Farrow, and R. A. Woods. 1976. Development of *Drosophila* on sterol mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet. Res.* 28:163–176.
- Brown, A. J., and A. M. Galea. 2010. Cholesterol as an evolutionary response to living with oxygen. *Evolution* 64:2179–2183.
- Dupont, S., L. Beney, J. F. Ritt, J. Lherminier, and P. Gervais. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* 1798:975–985.
- Dupont, S., L. Beney, T. Ferreira, and P. Gervais. 2011. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* 1808:1520–1528.
- Galea, A. M., and A. J. Brown. 2009. Special relationship between sterols and oxygen: were sterols an adaptation to aerobic life? *Free Radic. Biol. Med.* 47:880–889.
- Garre, E., F. Raginel, A. Palacios, A. Julien, and E. Matallana. 2010. Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 136:295–303.
- Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 81:89–96.
- Guan, X. L., C. M. Souza, H. Pichler, G. Dewhurst, O. Schaad, K. Kajiwara, H. Wakabayashi, T. Ivanova, G. A. Castillon, M. Piccolis, et al. 2009. Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol. Biol. Cell* 20:2083–2095.
- Heese-Peck, A., H. Pichler, B. Zanolari, R. Watanabe, G. Daum, and H. Riezman. 2002. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 13:2664–2680.
- Jacobson, K., O. G. Mouritsen, and R. G. Anderson. 2007. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.* 9:7–14.
- James, T. Y., F. Kauff, C. L. Schoch, P. B. Matheny, V. Hofstetter, C. J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443:818–822.
- Lees, N. D., B. Skaggs, D. R. Kirsch, and M. Bard. 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*—a review. *Lipids* 30:221–226.
- Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46–50.
- Lorenz, R. T., and L. W. Parks. 1991. Involvement of heme components in sterol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 26:598–603.

## BRIEF COMMUNICATION

- Munn, A. L., A. Heese-Peck, B. J. Stevenson, H. Pichler, and H. Riezman. 1999. Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol. Biol. Cell* 10:3943–3957.
- Odriozola, J. M., E. Waitzkin, T. L. Smith, and K. Bloch. 1978. Sterol requirement of *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4107–4109.
- Packer, L. 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1050S–1055S.
- Parks, L. W., and W. M. Casey. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:95–116.
- Parks, L. W., J. H. Crowley, F. W. Leak, S. J. Smith, and M. E. Tomeo. 1999. Use of sterol mutants as probes for sterol functions in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34:399–404.
- Pineau, L., J. Colas, S. Dupont, L. Beney, P. Fleurat-Lessard, J. M. Berjeaud, T. Bergès, and T. Ferreira. 2009. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic* 10:673–690.
- Shrivastava, S., and A. Chattopadhyay. 2007. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics using different fluorescent reporter probes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356:705–710.
- Souza, C. M., T. M. Schwabe, H. Pichler, B. Ploier, E. Leitner, X. L. Guan, M. R. Wenk, I. Riezman, and H. Riezman. 2011. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. *Metab. Eng.* 13:555–569.
- Summons, R. E., A. S. Bradley, L. L. Jahnke, and J. R. Waldbauer. 2006. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361:951–968.
- Tyler, K. M., A. Fridberg, K. M. Toriello, C. L. Olson, J. A. Cieslak, T. L. Hazlett, and D. M. Engman. 2009. Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J. Cell Sci.* 122:859–866.
- Weete, J. D., M. Abril, and M. Blackwell. 2010. Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS ONE* 5:e10899.
- Wiseman, H. 1993. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett.* 326:285–288.
- Xu, X., and E. London. 2000. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry (Mosc.)* 39:843–849.
- Zweytick, D., C. Hrastnik, S. D. Kohlwein, and G. Daum. 2000. Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, *erg4p*, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 470:83–87.

Associate Editor: J. Wernegreen



## Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an *in vivo* method with yeasts



Richtier Gonçalves da Cruz<sup>a,b</sup>, Laurent Beney<sup>a</sup>, Patrick Gervais<sup>a</sup>, Simone Possedente de Lira<sup>b</sup>, Thais Maria Ferreira de Souza Vieira<sup>b</sup>, Sebastien Dupont<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Univ. of São Paulo, College of Agriculture "Luiz de Queiroz", Av. Pádua Dias 11, 13418-900 Piracicaba, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Acerola extracts  
Antioxidant  
Phenolic compounds  
Ascorbic acid  
Yeast

### ABSTRACT

In this study, we compared the antioxidant activity of ripe and unripe acerola extracts with synthetic antioxidants (BHA and BHT). This activity was assessed by classical approaches (DPPH and ABTS) and by an *in vivo* method using yeasts. Acerola extracts contain phenolic compounds and ascorbic acid that exhibit radical scavenger capacity and reducing power. The results obtained with yeasts revealed that the acerola extracts and BHT either acted as antioxidants or presented no activity depending on the nature of the oxidant molecule used. BHA decreased yeast resistance to oxidative treatments and also showed deleterious effects even when oxidative treatments were not applied. The unripe acerola was the most efficient antioxidant in the *in vitro* experiments but not necessarily in the *in vivo* assays, showing the weakness of *in vitro* systems in predicting antioxidant responses for biological purposes. BHA presented cell damaging effects even in the absence of oxidizing reagents.

### 1. Introduction

The rancidification of lipids is one of the main food spoilage reactions leading to the emergence of flavors and odors that often mischaracterize the product concerned. This reaction causes the deterioration, quality loss and reduction of the nutritional value of food. To avoid this, the food industry makes considerable use of antioxidants (Frankel, 1998). Two basic classifications are applied to antioxidants: synthetic and natural. Generally, the synthetic antioxidants are phenolic compounds containing various degrees of alkyl substituents, whereas the natural antioxidants can be phenolic compounds such as quinone and lactone. Synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are widely used in the food industry due to their high antioxidant capacity and outstanding performance in the retardation of oxidation reactions. Thus, they have been the subjects of numerous studies related to their efficiency and toxicology (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Yehye et al., 2015). Beyond food applications, the characterization of the antioxidant property of molecules and mixtures is also of growing interest for biological systems. It has been suggested that an antioxidant rich diet would be beneficial to human health by preventing pathologies linked with oxidative stress such as cardiovascular diseases and cancers (López-Alarcón and Denicola, 2013).

Acerola fruit originates from the Antilles and is cultivated in the United States and Japan where it is consumed in large quantities. In Brazil, large-scale plantations began in 1949, although nowadays almost the entire production is destined for the internal market. It is known to be a rustic and resistant plant, spreading easily in various regions with different climatic conditions. Despite these characteristics, interest in acerola and studies on its economic potential only began in the 1940s when high levels of vitamin C were discovered in the fruit's edible portion (Mezadri, Fernández Pachón, Villaño, García Parrilla, & Troncoso, 2006). Several studies have reported particularly high concentrations of ascorbic acid and also appreciable amounts of phenolic compounds in acerola fruit, such as anthocyanins and a high antioxidant activity compared to other fruits considered as important sources of these compounds, such as grape, açai, strawberry, cherry, and mango (Chang, Alasalvar, & Shahidi, 2018). Due to the high concentration of these compounds, acerola fruits can be good candidates for the development of novel functional foods with promising effects on human health (Alvarez-Suarez et al., 2017; Belwal et al., 2018; Cappato et al., 2018). However, the presence and concentration of these compounds can change according to the degree of maturation of the fruit, (Lima et al., 2005; Righetto, Netto, & Carraro, 2005; Nóbrega, Oliveira, Genovese, & Correia, 2015).

Many studies, dealing with the replacement of synthetic

\* Corresponding author at: Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France.

E-mail address: [sebastien.dupont@u-bourgogne.fr](mailto:sebastien.dupont@u-bourgogne.fr) (S. Dupont).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.099>

Received 13 June 2018; Received in revised form 19 October 2018; Accepted 21 October 2018

Available online 26 October 2018

0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

antioxidants by natural ones obtained from fruit and vegetable sources, compared the *in vitro* antioxidant activity with those of certain synthetic antioxidants (de Oliveira et al., 2009; Sun, Liang, Shan, Viernstein, & Unger, 2011). However it is now believed that *in vivo* studies are required to elucidate the actual antioxidant activity of certain foods and extracts (Silva et al., 2005; Masís, Beta, & Moghadasian, 2016).

*Saccharomyces cerevisiae* is a unicellular eukaryotic organism that has been extensively studied because its cellular structure presents similarities with the cells of higher-level organisms. Its use in the evaluation of the cellular effects of chemical compounds is growing. Indeed, yeast has already been used to assess the cellular toxicity of heavy metals (Schmitt, Gellert, Ludwig, & Lichtenberg-Fraté, 2004) and food preservatives (Kasemets, Kahru, Laht, & Paalme, 2006). It is also widely used for the study of oxidative stress and aging since 30% of known genes involved in human disease have yeast orthologues. The antioxidant activities of natural extracts and/or pure compounds have been evaluated in yeasts (Silva et al., 2005). This evaluation is a fast, economic and reproducible *in vivo* assessment of antioxidant molecules. These results can be extrapolated to humans more easily than those obtained only with *in vitro* assays.

The aim of this work was to investigate the chemical composition of ripe and unripe acerola extracts and to assess their antioxidant properties in comparison with synthetic antioxidants (BHT and BHA). To do this, antioxidant activity was evaluated by classical *in vitro* approaches (DPPH and ABTS) and by *in vivo* experiments with *S. cerevisiae* yeasts. For the latter strategy, two strains of yeast (Wild-Type and *erg6Δ*) were subjected to oxidative treatments in the presence of various concentrations of antioxidants. The *erg6Δ* strain was used because this mutant exhibits higher sensitivity to oxidative perturbations than the Wild Type strain (Dupont et al., 2012). The protective role of antioxidant was assessed by measuring changes in cultivability, plasma membrane integrity and the quantity of intracellular ROS in yeasts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Acerola extract preparation and characterization

Samples of unripe and ripe acerola fruits were obtained from certified producers in the city of Juqueiropolis, Sao Paulo, Brazil, in January and February 2015. Two collections of 1 kg each were performed. The acerola fruits were transported under refrigeration on the same day of collection and immediately prepared. The fruits were washed in water and sanitized with sodium hypochlorite solution (100 mgL<sup>-1</sup>) for 10 min. They were then frozen in an ultra-freezer at -80 °C (Coldlab CL580-86V) and lyophilized (Lyophilizer L108, Liotop) until the complete removal of water. Then, the samples were crushed in a processor (Philips Walita R17625/71) for 5 min to obtain a powder. The powder was packed in plastic bags under vacuum and stored in a freezer at -80 °C until analysis. To prepare the extracts, 1 g of powder was mixed with 60 mL of distilled water and subjected to heating in a water bath with agitation at 35 °C for 50 min at 200 rpm in low light conditions. Afterwards, the samples were filtered under vacuum using a 47 mm diameter, white, smooth membrane made of cellulose ester, with a pore size of 0.45 μm (Millipore, Merck). Finally, the extracts were frozen at -80 °C, lyophilized (Lyophilizer L108, Liotop) and stored at -80 °C until analysis.

The quantification of the main phenolic compounds of acerola and ascorbic acid was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC). To quantify the compounds in the extracts of ripe and unripe acerola, a standard curve was constructed for quercetin (retention time - 14.8 min), ferulic (retention time = 7.7 min), p-coumaric (retention time - 6.5 min) and chlorogenic acid (retention time - 7.9 min) (phenolic compounds) from 7 to 100 mgL<sup>-1</sup> and for ascorbic acid from 100 to 1500 mgL<sup>-1</sup>. A preliminary work of our study revealed that these compounds were the main phenolic compounds accumulated in acerola. That's why, we choose to focus on these

compounds. The chromatography was performed on an Agilent HP series 1100 (UV/Vis), with a diode array detector (DAD), a quaternary pump and a UV detector with a wavelength of multiple waves (MWD), a cooled column compartment (30 °C), and a C-18 Phenomenex® column (4.6 × 250 mm - 5 μm). The mobile phase consisted of a gradient of sodium citrate solution (0.01 M) and methanol, beginning with 100% sodium citrate and ending with 100% methanol in 25 min. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 μL. The DAD was set to collect the signal at 275 nm for ascorbic acid and quercetin and 325 nm for the other compounds. Due to the low concentrations of the phenolic compounds in acerola extracts, we quantified these compounds by doping the samples with the standard to help the identification of the peaks. This protocol was done for each phenolic molecule.

### 2.2. *In vitro* approaches to assess antioxidant activity

#### 2.2.1. Reagents and chemicals

Folin-Ciocalteu reagent, Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid), azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Ascorbic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid, gallic acid, propidium iodide solution, ferulic acid, hydrogen peroxide solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH), menadione and D(+)-glucose were obtained from Sigma (Steinheim, Germany).

#### 2.2.2. Determination of reducing power

The reducing power for the acerola extracts (at concentration of 10.075 and 8.860 mg·mL<sup>-1</sup> for ripe and unripe acerola, respectively) was determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method according to the methodology proposed by Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventós (1999). The results were calculated from a standard curve with known concentrations (5–80 μg·mL<sup>-1</sup>) of gallic acid (linear equation  $y = 0.0069x - 0.0322$ ;  $R^2 = 0.9929$ ) and expressed in mg of gallic acid (GA) per 100 mL of extract and per gram of dry fruit. To assess the influence of the concentration of ascorbic acid in the extracts, the same analysis was performed in a solution of standard ascorbic acid at the same concentration as that found in the extracts of ripe and unripe acerola. The same procedure was followed for the DPPH and ABTS assays.

#### 2.2.3. Determination of free radical scavenging activity (DPPH assay)

The free radical scavenging activity was determined by the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method performed according to the protocol described by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995). The results were calculated from a standard curve with known concentrations (from 0.01 to 0.10 μmol·mL<sup>-1</sup>) of Trolox (linear equation  $y = -0.0023x + 0.379$ ;  $R^2 = 0.9912$ ) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (μmol of TEAC per 100 mL of extract).

#### 2.2.4. Determination of free radical scavenging activity (ABTS assay)

The free radical scavenging activity was determined by the free radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) method performed according to the protocol described by Re et al. (1999). The results were calculated from a standard curve with known concentrations (from 0.04 to 0.10 μmol·mL<sup>-1</sup>) of Trolox (linear equation  $y = -0.0013x + 0.3232$ ;  $R^2 = 0.9981$ ) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (μmol of TEAC per 100 mL of extract).

### 2.3. *In vivo* approaches to assess antioxidant activity

#### 2.3.1. Yeast strains and culture preparation

The strains used in this study are *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Wild Type) and *erg6Δ* mutant (EUROSCARF, Frankfurt, Germany). The *erg6* gene encoding the sterol C-24 methyltransferase, which catalyzes

the first of the five final steps of the ergosterol biosynthetic pathway, is nonessential. The corresponding mutant strain accumulates mainly zymosterol and cholesta-5,7,24-trienol instead of ergosterol. This mutant was chosen because it exhibits both higher plasma membrane permeability to pro-oxidant molecules (Branco, Marinho, Cyrne, & Antunes, 2004) and lower resistance to membrane lipid peroxidation (Dupont et al., 2012). These characteristics make this mutant highly suitable for oxidation experiments with hydrophobic and hydrophilic oxidants, as we used in our study. Subcultures of yeasts were performed by placing one isolated colony in 250 mL conical flasks containing 100 mL of Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) medium. The flasks were placed in a rotary shaker Excella E24 (New Brunswick Scientific TM, Edison, NJ, USA) at 250 rpm, 25 °C for 48 h. Cultures were performed by transferring 1 mL of subcultures into a flask containing 100 mL of fresh YPD medium and cells were grown at 25 °C for 24 h in a rotary shaker at 250 rpm. At harvest, cells were at the beginning of the stationary phase and the cell concentration was approximately  $10^8$  cells mL<sup>-1</sup>. The cell suspension (20 mL) was centrifuged for 5 min at  $2.800 \times g$  and 25 °C (Eppendorf, Hamburg, Germany, model 5810R). The cell pellet was washed twice and then the optical density (OD) was adjusted to 0.5 (600 nm, GE Healthcare® GeneQuant 1300 spectrophotometer) in phosphate buffered solution (PBS).

### 2.3.2. Effect of antioxidant molecules on yeast growth during culture

Before evaluating whether antioxidant molecules protect cells from oxidation, the effect of these molecules on yeast growth was assessed. To do this, the acerola extracts and the synthetic antioxidants (BHA and BHT) were added during the 24 h of culture at three different concentrations (50, 200 and 500 mg L<sup>-1</sup>). The viable cells (Colony-Forming Units (CFU) mL<sup>-1</sup>) were then enumerated on YPD agar by spread plating followed by incubation at 25 °C for 48 h.

### 2.3.3. Effect of oxidative treatments on yeasts

Menadione, tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were used as pro-oxidant molecules on yeasts to assess the protective effect of acerola extracts. Different pro-oxidant molecules were used because their action mechanisms on yeasts are distinct. The different effects of these molecules are linked to their chemical properties such as hydrophobicity/hydrophilicity which condition the cellular targets. The idea of the use of three pro-oxidant molecules was to assess if acerola extracts displayed specific or general antioxidant properties.

**2.3.3.1. Yeast cultivability after menadione treatments.** The effect of oxidative treatments induced by menadione on yeast viability was assessed. Oxidative stress induced by menadione is related to the production of superoxide anion in the cytosol of cells (Herdeiro, Pereira, Panek, & Eleutherio, 2006). Yeast suspensions (OD<sub>600 nm</sub> = 0.5) were placed in contact with menadione (0.4 mM) for 1 h. After that, the cells were centrifuged for 10 min at  $5.000 \times g$  and 25 °C and washed twice with PBS. Viable cells (CFU) were enumerated on YPD agar by spread plating followed by incubation at 25 °C for 48 h. The extracts of ripe and unripe acerola and the synthetic antioxidants (BHA and BHT) were added (50, 200 and 500 mg L<sup>-1</sup>) at the same time as menadione.

**2.3.3.2. Plasma membrane integrity after t-BOOH treatments.** Yeast plasma membrane integrity was evaluated by flow-cytometry and propidium iodide (PI) staining after treatment with t-BOOH, an oxidative agent preferentially targeting membrane lipids. PI is a fluorescent dye that is normally absent from living cells, but which rapidly enters them when the plasma membrane is permeabilized. Positive control was performed by applying drastic t-BOOH treatment to yeasts. Thus, yeast cells were exposed to 18 mM of t-BOOH for 24 h. Then the cells were centrifuged for 10 min at  $5.000 \times g$  and 25 °C and washed twice with PBS and then marked PI, to give a final

concentration of 2 µg mL<sup>-1</sup>. Flow cytometry was performed in FACSAria™ II flow cytometer (BD Biosciences, USA), excitation/emission; 493/636 nm to calculate the number of cells with lesions of their cytoplasmic membrane. The control of living cells was done with the cell solution (OD 0.5) and marked with PI.

To assess the protective effect of antioxidants, the cell solutions (OD 0.5) were exposed for 4 h in four different concentrations (50, 200, 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>) of each antioxidant (synthetic and acerola extracts) in the presence of t-BOOH (18 mM). The same procedure, using the flow cytometry as described previously, was applied to evaluate the influence of the extracts and the antioxidants on membrane integrity.

**2.3.3.3. Production of intracellular ROS after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments.** The measure of intracellular oxidation in yeasts was done with a chloromethyl derivative of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) following a protocol adapted from May, Qu, and Li (2003). Fluorescence within cells was quantified (Excitation/Emission: ~485/535 nm) using a plate reader (Beckman Coulter PARADIGM™). 100 readings were recorded with a 5 min break between each one in order to obtain the oxidation kinetics. Cell solutions (OD 0.5) were stained with 20 µM of CM-H2DCFDA and kept in the dark for 30 min at 37 °C with 5 mM of D-glucose and under agitation at 200 rpm. Then the cells were centrifuged for 10 min at  $5.000 \times g$  and 25 °C and rinsed twice with PBS supplemented with 5 mM of D-glucose. Intracellular oxidation was induced by 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The acerola extracts and the synthetic antioxidants were added in the same time as the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in two different concentrations, i.e. 25 and 50 mg L<sup>-1</sup> for BHA and 50 and 500 mg L<sup>-1</sup> for BHT and the acerola extracts.

### 2.4. Statistical analysis

Each analysis was triplicated, and the results are the averages of the values obtained. One-way analyses of variance (ANOVA) with Tukey pairwise comparisons of means were performed. *p* values of < 0.05 were considered as statistically significant (R software).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical composition and characterization of acerola extracts

The scavenging capacity of fresh fruit and vegetable extracts can be assessed by different methods including 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and oxygen radical absorption capacity (ORAC). It is widely known that chemical composition can significantly alter all these analyses, especially due to the presence of phenolic compounds and other molecules with antioxidant activity such as ascorbic acid (Mezadri et al., 2008; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Byrne, 2006). Table 1 lists the reducing power, the scavenging capacity for the DPPH and ABTS methodologies, and the quantification of quercetin and ascorbic, chlorogenic, *p*-coumaric and ferulic acids in the extracts of ripe and unripe acerola. Unripe acerola extracts exhibited higher scavenging capacity and reducing power (*p* < 0.05) than the ripe ones. In line with our results, Delva and Goodrich-Schneider (2013) showed that scavenging capacity and reducing power was also higher for unripe acerola extracts in comparison with two other stages of maturation. These values can be explained by the difference of the chemical composition between the extracts of ripe and unripe acerola and the interaction with the radicals (ABTS and DPPH). Indeed, the different compounds of the extracts have different types of affinities that involve electrostatic, steric hindrance and polar interactions that can give different values in the ABTS and DPPH assays.

In terms of composition, ascorbic acid concentration was almost two times higher in the unripe extracts (567 mg/100 mL of extract) than in the ripe ones (299 mg/100 mL of extract). However, the extracts of ripe

**Table 1**  
Chemical composition of acerola extracts.

	Ripe Acerola (100 mL of extract)	Unripe Acerola (100 mL of extract)
Reducing Power (mg of Gallic acid)	253.59 <sup>b</sup>	335.71 <sup>a</sup>
Scavenging Capacity DPPH ( $\mu\text{mol Trolox}$ )	1641.72 <sup>b</sup>	2141.55 <sup>a</sup>
Scavenging Capacity ABTS ( $\mu\text{mol Trolox}$ )	1656.73 <sup>b</sup>	2089.99 <sup>a</sup>
Ascorbic Acid (mg)	298.93 <sup>b</sup>	566.86 <sup>a</sup>
Quercetin ( $\mu\text{g}$ )	205.10 <sup>a</sup>	2.80 <sup>b</sup>
Chlorogenic Acid ( $\mu\text{g}$ )	1152.68 <sup>a</sup>	741.32 <sup>b</sup>
<i>p</i> -Coumaric Acid ( $\mu\text{g}$ )	136.72 <sup>a</sup>	70.26 <sup>b</sup>
Ferulic Acid ( $\mu\text{g}$ )	44.83 <sup>a</sup>	21.26 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Means followed by different letters in the same line indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey test. Experiments were performed in triplicate and repeated three times.

acerola presented higher levels of phenolic compounds. Vendramini and Trugo (2000) reported a loss of ascorbic acid of about 50% from the ripe (red) to unripe (green) acerola fruit. This is very similar to our results (47%). The probable explanation for this difference between acerola extracts is the elimination of ascorbic acid during fruit maturation (Badejo, Fujikawa, & Esaka, 2009). Butt (1980) attributes the low concentration of ascorbic acid in ripe acerola to the increase of enzymatic activity in the form of ascorbic acid oxidase. Concerning the phenolic compounds (chlorogenic, *p*-coumaric and ferulic acids), their higher concentrations in ripe acerola samples can be explained by the degradation of compounds like chlorophylls into substances like carotenoids, pigments and phenols during the maturation process (Alves, Chitarra, & Chitarra, 1995).

Ascorbic acid influences the scavenging activity and reducing power assays. This influence was assessed in the ripe and unripe acerola extracts (Table 2). For that, we prepared solutions made with the standard of ascorbic acid at the same concentration we found in ripe and unripe acerola extract to assess the effect of ascorbic acid in comparison to the total acerola extracts. There is wide divergence in the literature regarding these values, since it is possible to find values that range between 40 and 100% (Delva & Goodrich-Schneider, 2013; Mezdari et al., 2006). In our study, the influence of ascorbic acid assessed by the reducing power analysis ranged from 59.12 to 98.12% for ripe and unripe acerola, respectively. These results appear to explain the high levels of reducing power of unripe acerola, thus supporting the idea that this method cannot be considered for 'total phenol' measurement since ascorbic acid is not a phenolic compound (de Oliveira et al., 2009). Consequently, this could lead to overestimating the values of the phenolic compounds.

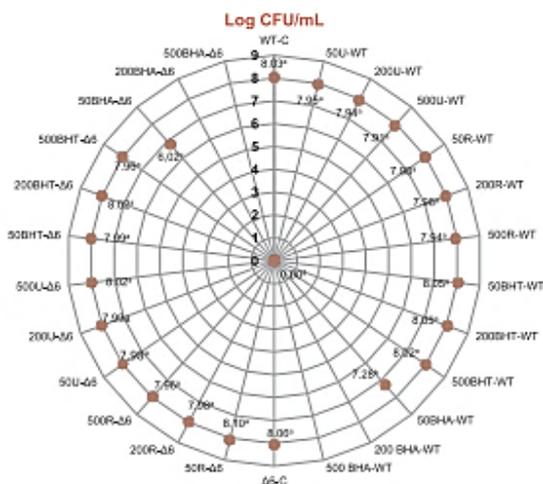
### 3.2. Assessment of antioxidant activity using *S. cerevisiae*

In vivo experiments were performed on the WT yeast strain of *S. cerevisiae* and on the *erg6Δ* mutant strain. This mutant was chosen because of its low resistance to oxidative treatments in comparison to the WT strain (Branco et al., 2004; Dupont et al., 2012) which could reveal the antioxidant property of the compounds tested more accurately.

**Table 2**  
Influence (in %) of ascorbic acid on DPPH, ABTS and on the reducing power of the ripe and unripe acerola extracts.

Method	Unripe Acerola	Ripe Acerola
DPPH	90.78%	75.29%
ABTS	92.30%	78.53%
Reducing Power	98.12%	59.12%

<sup>a</sup>Means followed by different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey test. Experiments were performed in triplicate and repeated three times.



**Fig. 1.** Cell concentration ( $\log \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of WT and *erg6Δ* strains of *S. cerevisiae* after growth in the presence of different concentrations of extracts of ripe and unripe acerola and synthetic antioxidants. Sample identification: 50, 200, 500 (concentration in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); WT = Wild Type;  $\Delta 6$  = *erg6Δ*; C = control (without extract or antioxidants); U = Unripe acerola; R = Ripe acerola. Means followed by different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

#### 3.2.1. Effect of antioxidant molecules on yeast growth

Although antioxidants can exhibit beneficial effects in cell resistance to oxidative treatments, some of them could give rise to toxicological issues. To assess this, acerola extracts and synthetic antioxidants (BHT and BHA) were added during the WT and *erg6Δ* yeast culture (24 h). The cell concentrations obtained at the end of the culture are presented in Fig. 1.

In control conditions (without antioxidant), the yeast concentration of both strains reached  $8 \log \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  at the end of culture. Supplementation of the culture medium with acerola extracts (ripe and unripe) and BHT led to yeast growth similar to the control conditions. However, adding BHA led to deleterious effects in cell cultivability at 200 and  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  with the absence of colony growth at these concentrations for both strains. The inhibitory effect of BHA on biological cells has already been observed. Indeed, in a comparative study of BHA with two other synthetic antioxidants (tert-butylhydroquinone and propyl gallate), the effect of BHA on *S. cerevisiae* growth was the strongest with no viable cells at concentrations higher than  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Eubanks & Beuchat, 1982). In other studies with bacteria (*S. aureus*), some authors reported 93 and 100% inhibition of cell growth in the presence of BHA at a concentration of  $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Ayaz, Lueddecke, & Branen, 1980).

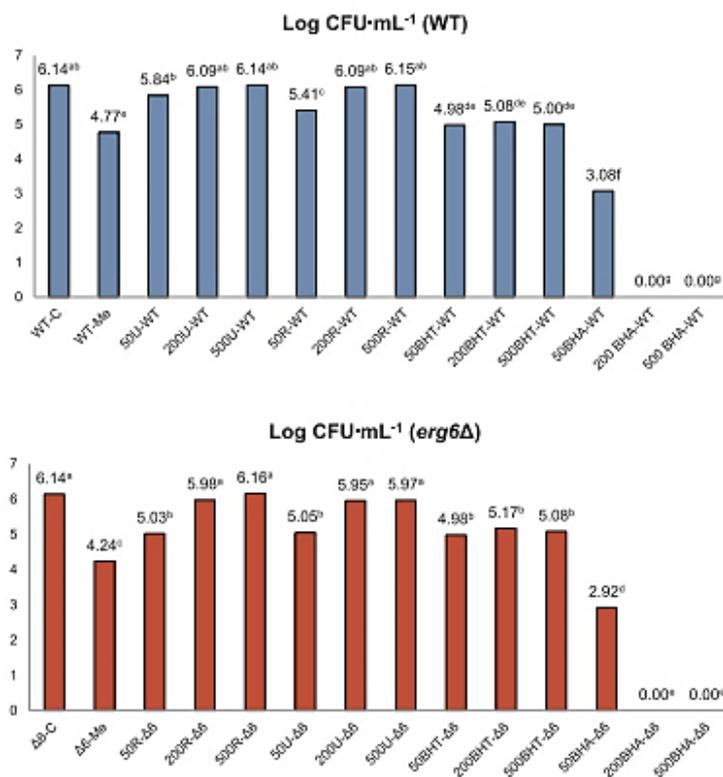


Fig. 2. Viability (log CFU·mL<sup>-1</sup>) of *S. cerevisiae* strains after exposure to menadione (0.4 mM, 1 h) in the presence (or not) of different concentrations of extracts of ripe and unripe acerola and synthetic antioxidants. Sample identification: 50, 200, 500 (concentration in mg·L<sup>-1</sup>); WT = Wild Type; Δ6 = *erg6Δ*; C = control (without extract, antioxidants or oxidant); Me = with menadione (without antioxidant), U = Unripe acerola; R = Ripe acerola. Means followed by different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

### 3.2.2. Estimation of yeast viability after menadione treatment in the presence of acerola extracts

Yeast survival was estimated after treatments with menadione in the presence or not of acerola extracts and synthetic antioxidants (Fig. 2). Menadione is known to cause specific oxidation in the intracellular compartment by oxidation of cytosolic proteins with the superoxide anion (Herdeiro et al., 2006).

The results showed that the extracts of ripe and unripe acerola enhanced the resistance of yeast to menadione treatments for both strains. However, no difference was observed between ripe and unripe acerola extracts. This contradicts the *in vitro* tests in which the scavenging capacity and reducing power were significantly higher for unripe acerola (Table 1). These results highlight the importance of studying the antioxidant effects with different methods. Thus, a chemical environment does not necessarily reflect the responses that will be obtained with living organisms, mainly due to the instability and lifetime of the radicals formed.

Concerning the synthetic antioxidants, BHT did not display a protective effect on yeasts during menadione treatments. The survival of yeast was even lower in the presence of BHA than in control (without antioxidant). Indeed, no cell growth was observed after treatments in the presence of 200 and 500 mg·L<sup>-1</sup> of BHA. This result confirms the deleterious effect of BHA on biological cells.

### 3.2.3. Yeast membrane integrity after oxidative treatments with t-BOOH

t-BOOH is an oxidant that can cause lipid peroxidation in the

cellular membrane by reaction with the t-butoxyl radical (Gazdag et al., 2014). Flow cytometry is frequently used to collect information on the cell alteration, such as damage to DNA, membrane or other intracellular organelles. In this study, cells stained by PI were analyzed by flow cytometry to measure the damage caused by the oxidant t-BOOH to the membrane of the *S. cerevisiae* strains (WT and *erg6Δ*) and to assess if the acerola extracts and the synthetic antioxidants could protect the cells from this oxidant.

Fig. S1 shows the difference between permeabilized and non-permeabilized cells exposed to t-BOOH (18 mM) for 24 h (positive control). The separation of cell as a function of permeabilized (quadrant P1) and non-permeabilized membranes is clear and used as a standard to determine the percentage of intact cells in the experiment.

Before assessing whether antioxidants can prevent oxidation effects induced by t-BOOH on yeast membrane integrity, PI staining was analyzed with only antioxidants (without t-BOOH). Table S1 presents the percentage of cells with intact membranes after exposure to synthetic antioxidant (BHA or BHT) and to extracts of ripe or unripe acerola for 4 h at different concentrations. In general, BHT and extracts of ripe and unripe acerola did not cause damage to the membrane, resulting in intact cell values close to the control samples for both strains. In contrast, the presence of BHA in cell suspension led to yeast plasma membrane permeabilization. This effect increased with BHA concentration and was slightly higher for the *erg6Δ* strain than the WT strain. For the highest concentration tested in our study (500 mg·L<sup>-1</sup>), 99.9% of the cell population was permeabilized for both strains. These

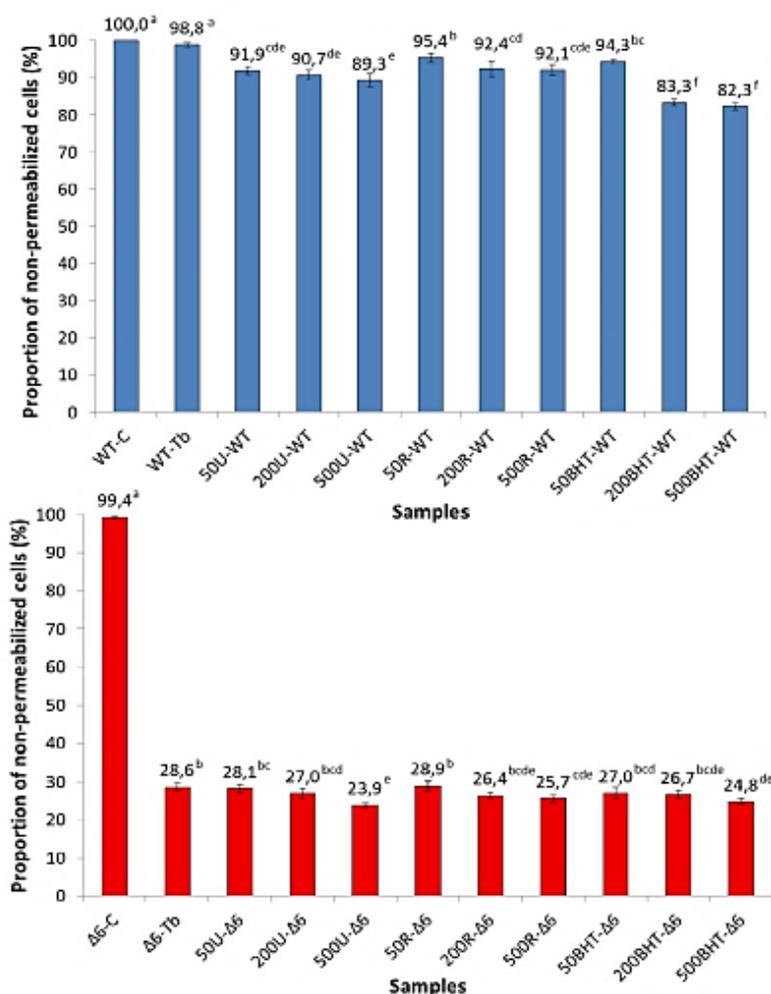


Fig. 3. Proportion of *S. cerevisiae* cells (*erg6Δ* and WT) with intact membrane after 4 h exposure to t-BOOH (18 mM) in the presence (or not) of synthetic antioxidant (BHT) or extracts of ripe and unripe acerola. Sample identification: 50, 200, 500 (antioxidant concentration in  $\text{mg L}^{-1}$ ); WT = Wild Type; Δ6 = *erg6Δ*; C = control (without extract, antioxidants or oxidant); Tb = only with t-BOOH (without antioxidant), U = Unripe acerola; R = Ripe acerola. Means followed by different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

results explain the lack of growth of yeasts in the presence of BHA since membrane integrity is required for cell metabolism and division.

Cell membrane integrity was then measured after the oxidative stress condition (t-BOOH, 18 mM for 4 h) in the presence or not of acerola extracts or BHT (Fig. 3). Due to its deleterious effect on membrane integrity without oxidative treatments, the results obtained with BHA are not presented. The *erg6Δ* strain was more sensitive to oxidant stress with t-BOOH than the WT strain in the conditions studied. Indeed, the membranes of 71.2% of the *erg6Δ* strain population were altered, whereas only 1.1% of the cells of the WT strain presented alterations of the plasma membrane. The higher sensitivity of the mutant strain in comparison to the WT could be explained by its deficiency in the production of ergosterol which can exhibit antioxidant properties and act as a plasma membrane reinforcer (Brewer, 2011; Dupont et al., 2012).

In the presence of t-BOOH, none of the compounds presented antioxidant activity for this oxidant since all the samples displayed slightly lower or equal values of permeabilization in comparison with the

control samples without antioxidants (samples “Tb”). These results indicate that acerola extracts are not able to protect plasma membrane lipids from oxidation induced by t-BOOH. The effectiveness of antioxidants in complex systems depends on many factors, including the partitioning properties of the molecules between lipid and aqueous phases (Frankel & Meyer, 2000). These properties influence the cellular localization of the antioxidants. In our case, the inefficiency of the hydrophobic compounds of acerola extracts (mainly phenolic acids, as ferulic acids, and flavonoids, as quercetin) could be explained by a low capacity of these compounds to be incorporated in the plasma membrane of yeast cells.

#### 3.2.4. Intracellular ROS production induced by $\text{H}_2\text{O}_2$ treatments

Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reacts with partially reduced transition metals ( $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Cu}^+$  for example) leading to the formation of the extremely reactive hydroxyl radical that induces intracellular oxidation. To evaluate intracellular oxidation, CM-H2DCFDA was used as an intracellular marker. This reagent is used for *in vivo* oxidation assays and

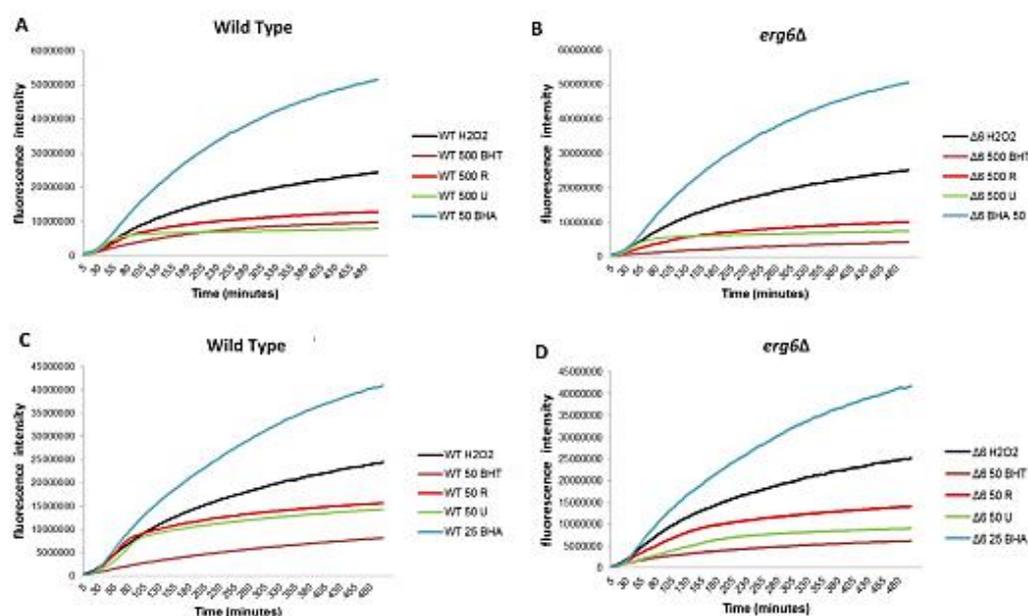


Fig. 4. Intracellular oxidation (assessed by CM-H2DCFDA) of *S. cerevisiae* cells WT (A and C) and *erg6Δ* (B and D) induced by  $H_2O_2$  treatments (10 mM) in the presence of the acerola extracts and the synthetic antioxidants. Sample identification: 25, 50, 500 (antioxidant concentration in  $mg L^{-1}$ ); WT = Wild Type;  $\Delta 6 = erg6\Delta$ ; H2O2 = with oxidant ( $H_2O_2$ ) but without antioxidant, U = Unripe acerola; R = Ripe acerola.

becomes fluorescent upon oxidation by intracellular reaction oxygen species (ROS) (Pan et al., 2009). In this study,  $H_2O_2$  (10 mM) was added to induce the oxidation of the *S. cerevisiae* strains in the presence of ripe and unripe acerola extracts and synthetic antioxidants (BHA and BHT) in order to evaluate their antioxidant capacity over time. The selected concentrations were 25 and  $50 mg L^{-1}$  for BHA, and 50 and  $500 mg L^{-1}$  for the extracts of acerola and BHT (Fig. 4), since these compounds were not deleterious for yeasts as shown in the former analysis, contrary to BHA.

The results were divided into four graphics according to the antioxidant compound concentrations and the yeast strains. Graphics 3A and 3B show the results for the highest concentrations, i.e.  $500 mg L^{-1}$  for BHA and  $500 mg L^{-1}$ , of the acerola extracts and BHT for WT and *erg6Δ* strains, respectively. Graphics 3C and 3D show the results for the lowest concentrations, i.e.  $25 mg L^{-1}$  for BHA and  $50 mg L^{-1}$ , of the acerola extracts and BHT for WT and *erg6Δ* strains, respectively.

During the first minutes of the oxidative treatments (< 30 min), it was not possible to distinguish the specific antioxidant effect of the different compounds. The continuation of data recordings over time revealed differences between the different compounds. Acerola extracts and BHT decreased the kinetics of intracellular ROS production. This decrease depended on the concentration of the different compounds. For this type of oxidative treatment, BHT presented better efficiency in comparison with the acerola extracts. When we compared acerola extracts, the unripe ones decreased the oxidation kinetics slightly more than the ripe ones. Regarding BHA in the presence of  $H_2O_2$ , it acted as a pro-oxidant at all the concentrations studied.

In all the *in vivo* tests of antioxidant activity performed in our study, BHA, whose antioxidant capacity has been demonstrated *in vitro* (Caleja, Barros, António, Oliveira, & Ferreira, 2017), was found to be inefficient in preventing cellular oxidation, more often than not playing a pro-oxidant and cell damaging role even in the absence of oxidative reagents. It is important to emphasize that many studies using chemical based assays have compared the efficiency of BHA with vegetable

extracts, in view to replacing it and the authors mostly found a similar or higher antioxidant activity for the new source (Bandyopadhyay, Chakraborty, & Raychaudhuri, 2007; de Camargo, Vieira, Regitano-D'Arce, Calori-Domingues, & Canniatti-Brazaca, 2012). However, this is not sufficient for recommendation for human consumption because, as shown in this work, different concentrations and *in vivo* assays can provide various responses.

#### 4. Conclusion

In conclusion, it is not simple to state that one molecule or extract displays an antioxidant activity. This depends on several factors such as chemical composition, concentration, kinetic reactions, concentration and localization of the oxidation site (in case of *in vivo* analysis). The analysis of acerola extracts revealed that they contained significant amounts of phenolic compounds and ascorbic acid that display radical scavenger capacity and reducing power. *In vitro* experiments (ABTS and DPPH) showed that unripe acerola extracts displayed better antioxidant properties than the ripe ones due to a higher concentration of ascorbic acid. In *in vivo* experiments, acerola extracts protected yeasts from oxidative treatments induced by menadione and  $H_2O_2$  but both extracts presented similar effects. Moreover, the antioxidant property of acerola extracts must be nuanced since they did not protect the yeast membrane from t-BOOH, an oxidizing agent targeting the cell membrane. These results indicate that the chemical assays of the acerola extracts did not fully reflect their effects in the *in vivo* tests, highlighting the complexity to find an *in vitro* analytical method reliable enough to estimate antioxidant activity capable of mirroring *in vivo* assay results. This complexity was illustrated by the results obtained with the synthetic antioxidant BHA that displayed pro-oxidant and cell damaging effects in the *in vivo* experiments. Thus, this study reinforces the increasingly accepted idea that characterizing the antioxidant property of molecules requires the combination of *in vitro* and *in vivo* assays. The use of eukaryotic unicellular organisms, like *S. cerevisiae* yeasts, is a



good model to perform simple *in vivo* assays. Results based on these assays could be very useful before experiments on complex eukaryotic organisms such as mice or rats.

#### Acknowledgments

The authors thank the Dimacell Imaging Resource Center for technical support during spectrofluorimetry experiments. This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)”, AgroSup Dijon, the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES and BRAFAGRI CAPES) and FAPESP Grant (2014:15760-3), BIOTA/BIOprospecTA FAPESP Grant (2013/50228-8) from Brazil.

#### Author declaration

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.099>.

#### References

- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Gasparri, M., Mazzoni, L., Santos-Buelga, C., González-Panmá, A. M., ... Quiles, J. L. (2017). The protective effect of acerola (*Malpighia emarginata*) against oxidative damage in human dermal fibroblasts through the improvement of antioxidant enzyme activity and mitochondrial functionality. *Food & Function*, 8(9), 3250–3258.
- Alves, R., Chitarra, A., & Chitarra, M. (1995). Postharvest physiology of acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruits: Maturation changes, respiratory activity and refrigerated storage at ambient and modified atmospheres. *Acta Horticulturae*, 370, 223–230.
- Ayaz, M., Lueddecke, L., & Brannen, A. (1980). Antimicrobial effect of butylated hydroxytoluene and butylated hydroxytoluene on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 43(1), 4–6.
- Badejo, A. A., Fujikawa, Y., & Esaka, M. (2009). Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology*, 166(6), 652–660.
- Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R., & Raychaudhuri, U. (2007). A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 842–851.
- Belwal, T., Devkota, H. P., Hassan, H. A., Ahluwalia, S., Ramadan, M. F., Mocan, A., & Atanasov, A. G. (2018). Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. *Trends in Food Science & Technology*.
- Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Ayrines, F. (2004). Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6501–6506.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
- Butt, V. (1980). Direct oxidases and related enzymes. *Metabolism and respiration* (pp. 81–123). Elsevier.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346.
- Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Moraes, J., Pires, R. P., Rocha, R. S., Silva, R., ... Rodrigues, F. N. (2018). Why acerola-flavoured drink submitted Ohmic heating: Bioactive compounds, antioxidant capacity, thermal behavior, water mobility, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Chemistry*, 263, 81–88.
- Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2018). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects – A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–25.
- de Camargo, A. C., Vieira, T. M. F. D. S., Regitano-D’Arce, M. A. B., Calori-Domingues, M. A., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2012). Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3073–3084.
- de Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., de Barros, M. P., Mano, C. M., & Goulart, M. O. F. (2009). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115(2), 469–475.
- Delva, L., & Goodrich-Schneider, R. (2013). Antioxidant activity and antimicrobial properties of phenolic extracts from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(5), 1048–1056.
- Dupont, S., Lemétais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution*, 66(9), 2961–2968.
- Eubanks, V., & Beuchat, L. (1982). Effects of antioxidants on growth, sporulation and pseudomycelium production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science* 47, 5, 1717, 1722.
- Frankel, E. (1998). *Lipid oxidation*. Dundee, UK: The Oily Press Google Scholar.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941.
- Gazdag, Z., Máté, G., Čertík, M., Türmer, K., Vitróg, E., Pécsi, L., & Pestli, M. (2014). tert-Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and erg5Δ. *Journal of Basic Microbiology*, 54(51).
- Herdeiro, R., Pereira, M., Panek, A., & Eleutherio, E. (2006). Trolox protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(3), 340–346.
- Kasems, K., Kahru, A., Laht, T.-M., & Paalme, T. (2006). Study of the toxic effect of short- and medium-chain monocarboxylic acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* using the CO<sub>2</sub>-auxo-accelerostat fermentation system. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 206–215.
- Lima, V. L., Melo, E. A., Maciel, M. I. S., Prazeres, F. G., Musser, R. S., & Lima, D. E. (2005). Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, 90(4), 565–568.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10.
- Masís, K., Beta, T., & Moghadasian, M. H. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on *in vitro* and *in vivo* studies. *Food Chemistry*, 196, 90–97.
- May, J. M., Qu, Z.-C., & Li, X. (2003). Ascorbic acid blunts oxidant stress due to menadione in endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 411(1), 136–144.
- Mezadri, T., Fernández Pachón, M. S., Villano, D., García Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2006). El fruto de la acerola: composición, características productivas e importancia económica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 101–109.
- Nóbrega, E. M., Oliveira, E. L., Genovese, M. L., & Correia, R. T. (2015). The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of Acerola (*Malpighia emarginata*) residue. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(2), 131–141.
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., ... Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 5(18), 2067–2076.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Righetto, A., Netto, F., & Carraro, F. (2005). Chemical composition and antioxidant activity of juices from mature and immature acerola (*Malpighia emarginata* DC). *Food Science and Technology International*, 11(4), 315–321.
- Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J., & Lichtenberg-Fraté, H. (2004). Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 142–150.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Silva, C., Herdeiro, R., Mathias, C., Panek, A., Silveira, C., Rodrigues, V., ... Eleutherio, E. (2005). Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 52(3), 229–233.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-cioalcutu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178 Elsevier.
- Sun, Y.-F., Liang, Z.-S., Shan, C.-J., Viernstein, H., & Unger, F. (2011). Comprehensive evaluation of natural antioxidants and antioxidant potentials in *Ziziphus jujuba* Mill. var. spinosa (Bunge) Hu ex HF Chou fruits based on geographical origin by TOPSIS method. *Food Chemistry*, 124(4), 1612–1619.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675.
- Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, 71(2), 195–198.
- Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Hamid, S. B. A., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., & Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 295–312.



## Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract

Audrey Raise<sup>a</sup>, Sébastien Dupont<sup>a,\*</sup>, Cyril Iaconelli<sup>a</sup>, Christian Caliri<sup>b</sup>, Alexandre Charriau<sup>a</sup>, Patrick Gervais<sup>a</sup>, Odile Chambin<sup>a,1</sup>, Laurent Beney<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000, Dijon, France

<sup>b</sup> Università Degli Studi di Camerino, Camerino, Italy



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Encapsulation  
Drug delivery system  
*Faecalibacterium prausnitzii*  
Commensal gut probiotic bacteria  
Lipid base (Gelucire® 43/01)  
ALMP beads

### ABSTRACT

Anaerobic commensal gut bacteria are among the most promising future treatments for many diseases. Because of their sensitivity to oxygen and to the harsh conditions of the gut, few studies on formulations that deliver bacteria in a viable and functional form to the intestine have been done. The aim of this study was to develop a reliable and easy-to-scale-up process meeting these requirements. The designed process consisted of mixing a freeze-dried bacterium, *Faecalibacterium prausnitzii*, with a melted hydrophobic matrix (Gelucire® 43/01) to encapsulate them into a solid lipid base after cooling. These formulations were compared with freeze-dried beads containing bacteria encapsulated by ionotropic gelation. This work demonstrates that both formulations improve the survival of bacteria in the stomach and distal jejunum buffers during a digestive exposure test. However, only lipid inclusion provided sufficient protection suitable for therapeutic application. Nevertheless, Gelucire® poorly stabilizes bacteria during storage, unlike the freeze-dried beads.

### 1. Introduction

The human gut microbiota is composed of several trillions of microorganisms, including bacteria, archaea, eukarya, viruses and parasites. Among them, bacteria are the most prevalent with over 1000 different species [1–3]. Since the 1990s, these bacteria have become of increasing interest to the medical profession because they play a crucial role in maintaining the health and wellness of their host and can also prevent some pathologies. Indeed, several studies have demonstrated that some gut bacteria show an inverse correlation with some disease activity [2]. This is especially the case for inflammatory bowel disease (ulcerative colitis, Crohn's disease), whose appearance is reduced in individuals with normal or high levels of *Faecalibacterium prausnitzii* or *Roseburia hominis* in their microbiota, or for obesity or type II diabetes and *Akkermansia muciniphila* [4–6].

Therefore, these bacteria could be part of either a new generation of probiotics or live biotherapeutic products, called 'biological products' that (1) contain living organisms, such as bacteria; (2) prevent, treat or cure a disease or condition in humans and (3) are not vaccines [7]. Most of these promising bacteria are extremely oxygen sensitive, which considerably impedes their therapeutic use [7]. It is, therefore, essential

to develop strategies to protect them from oxygen during the production process and until administration to the patients, and from the harsh conditions of the digestive tract, so that they will be delivered in a viable and functional state to the end of the small intestine or the colon, their site of action. Despite the great need to develop such delivery strategies, few studies have been performed on formulations containing commensal gut probiotic bacteria, and none of the developed strategies kept these bacteria viable and functional during both storage and the digestive process [8,9].

Encapsulation of bacteria is one of the most promising delivery methods [10]. It can be defined as a physicochemical or chemical process by which compounds are retained within an encapsulation matrix acting as a physical barrier that protects them from adverse environmental conditions and delivers them to the desired place [10]. In the case of commensal gut bacteria, the encapsulation matrix is intended to protect the bacteria, and deliver them in a functional form to the intestine by reducing cell injuries by oxygen, moisture and temperature exposure during storage and by the acidic pH of the stomach, the digestive enzymes and the bile salts during the gastro-intestinal transit steps. Currently, encapsulation of bacteria is performed by extrusion, emulsion or spray-drying. Extrusion is the oldest method. It consists to mix bacteria

\* Corresponding author.

E-mail address: [sebastien.dupont@u-bourgogne.fr](mailto:sebastien.dupont@u-bourgogne.fr) (S. Dupont).

<sup>1</sup> Odile Chambin and Laurent Beney participated equally in this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101608>

Received 2 October 2019; Received in revised form 7 February 2020; Accepted 17 February 2020

Available online 18 February 2020

1773-2247/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

with a hydrocolloid solution and to extrude the cell suspension through a syringe needle or a nozzle to obtain droplets. These droplets will then fall into a hardening solution or setting bath and become beads instantly. This method presents many advantages. It is simple to settle, cheap, uses gentle operations, does not involve deleterious solvent, can be done under aerobic and anaerobic conditions and allows to have a high survival rate [11,12]. Regarding the emulsion technique [11,12], a small volume of a cell-hydrocolloid polymer suspension is added to a large volume of a vegetable oil. The mixture is then homogenized to form a water-in-oil emulsion which leads to the insolubilization of the polymer and the formation of gelled beads. This method is easy to scale up and allows to have a high survival rate of bacteria because it limits the physical stress imposed on bacteria during encapsulation. For the spray-drying method [11,12], bacteria are mixed with a polymer matrix and the cell suspension is then sprayed into air or nitrogen flux to produce fine droplets. The droplets are then dried with hot air and beads are obtained. The advantages of this technique are its high reproducibility, its low execution time and its relatively low cost. However, these techniques have some disadvantages that prevent them from efficiently encapsulating commensal gut bacteria at large scale: extrusion is hard to scale up due to the slow formation of the beads, emulsion is expensive and renders wide sizes and shape ranges of particles, and spray-drying uses hot gas, which can affect bacterial survival [11,12].

The aim of this study was to develop a new process of encapsulation for bacteria that is reliable and easy to scale up. The process we studied was the mixing of dried bacteria with a lipid base (Gelucire<sup>®</sup> 43/01) because its hydrophobic nature could limit the rehydration of bacteria and protect them during storage and the digestive steps. Gelucire<sup>®</sup> 43/01 was chosen for its low melting temperature (43 °C) to avoid thermal stress during the inclusion of dried bacteria. To study the effectiveness of this process, the formulations were compared with formulations obtained by ionotropic gelation. We used the commensal gut probiotic bacterium *F. prausnitzii*. First, the resistance of fresh and dried non-encapsulated cells to buffers mimicking the digestive tract environment was investigated to assess the protection requirements of this bacterium. Then, the impact of the process and storage on bacterial survival was evaluated. Finally, the protective effects of the formulations were investigated by immersing them in the same buffers as those used for testing the resistance of non-encapsulated cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preservation of the anaerobic conditions during formulation

To protect the bacteria from oxygen, they were handled as much as possible inside an anaerobic chamber (Bactron 1-2, Sheldon Manufacturing, USA) filled with a gaseous mixture of 85% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub> and 10% CO<sub>2</sub> (N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>). All liquid culture media and solutions in contact with the bacteria were degassed. A N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> gaseous mixture was also used when anaerobic conditions became necessary.

### 2.2. Bacterial strain and growth conditions

*F. prausnitzii* CNCM I-4573 were kindly provided by INRA (Jouy-en-Josas, France). The stock cultures were prepared in an anaerobic chamber by mixing at a 3:1 ratio (v/v) a fresh culture and a degassed 80% (w/w) glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) aqueous solution. The mixture was then aliquoted (800 µL in 1.8 mL sealed cryotubes) and stored under anaerobic conditions at -80 °C. The strain was grown by inoculating the cells from one cryotube into one Hungate culture tube, sealing with a butyl rubber septa and filling it with 10 mL of degassed optimized medium with 2% (v/v) plant peptones (provided by Exelion Biosciences, Paris, France). These cultures were incubated under anaerobic conditions at 37 °C for 24 h and used to inoculate fresh and degassed medium. The incubation was continued under anaerobic conditions at 37 °C for 16 h until the late exponential phase. The final

population was estimated by the plate method and was about 10<sup>9</sup> CFU/mL. The cells were harvested by centrifugation (Centrifuge 5430, Eppendorf) at 2000 g for 5 min at room temperature. The supernatant was stored separately.

### 2.3. Freeze-drying of bacteria

The harvested cells were mixed with the supernatant and protectant solution (1:1, v/v) in the anaerobic chamber and concentrated 10-fold. The protectant solution contained 0.49 M sucrose (Sigma-Aldrich) and 5 mM L-cysteine (Sigma-Aldrich), was degassed and sterilized with a 0.20 µm cellulose acetate filter before use. The obtained cell mixture was aliquoted in 1 mL amber vials, and the vials were placed in hermetic boxes containing a N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> gaseous mixture. The cell mixture was then frozen in a -80 °C freezer and freeze-dried subsequently until the moisture content less than 10% (FreeZone<sup>®</sup> Stopping Tray Dryers, Labconco, USA; FreeZone<sup>®</sup> 18 L, Labconco, USA). Then, the vials were sealed with butyl rubber stoppers and aluminium screw caps under anaerobic conditions.

### 2.4. Encapsulation of bacteria

#### 2.4.1. Bacterial encapsulation in ALMP beads

The whole encapsulation process was carried out at room temperature inside the anaerobic chamber. The bacteria were encapsulated by ionotropic gelation with the extrusion method. The biopolymer used was amidated low-methoxyl pectin (ALMP) with a degree of esterification ≈ 22–28% and of amidation ≈ 20–23% (Unipectin<sup>®</sup> 305C, Cargill, Minneapolis, USA). The cell mixture was composed of cell concentrate (see Section 2.2), a solution of phosphate buffer saline (PBS, Sigma-Aldrich) with 4% ALMP and supernatant. ALMP was sterilized under a UV lamp, dissolved in sterilized PBS under continuous stirring for 24 h and degassed. Afterwards, the cellular concentrate was suspended in pectin and the supernatant solution (1:1, v/v) under stirring. A volume of PBS and supernatant was used that concentrated the cells 10-fold compared with the final culture. Then, a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson, France) was used to deliver the cell mixture drop by drop into the gelling solution. Four gelling solutions, each composed of 2% (w/v) calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich), were tested. For each solution, CaCl<sub>2</sub> was dissolved in (a) PBS, (b) PBS and supernatant (1:1, v/v), (c) PBS with protectants or (d) PBS with protectants and supernatant (1:1, v/v). The protectants used were the same as those used for the freeze-drying step. For the tests with protectants inside the gelling solution, the same protectants in the same concentrations were added in the pectin solution to decrease osmotic problems during the bead curing. The syringe used to deliver the solution drop by drop was 80 mm long and had a diameter of 2 mm (Terumo, Guyancourt, France). It was placed 3 cm above the gelling solution, and the flow was fixed at 1.37 mL/min. To obtain complete gelation, the beads were stirred in the gelling solution at 300 rpm at room temperature (curing time). The formed beads were then washed with PBS, aliquoted (1 g/amber vial), placed in hermetic boxes filled with N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> gaseous mixture, and subsequently frozen and freeze-dried as described previously.

#### 2.4.2. Bacterial encapsulation in lipid base (Gelucire<sup>®</sup> 43/01)

In a laminar flow hood, freeze-dried bacteria obtained as described in Section 2.3 were mixed with previously melted Gelucire<sup>®</sup> 43/01, kindly provided by Gattefossé, in a 1:30 (w/w) ratio at 70 °C. The Gelucire<sup>®</sup> was sterilized at 121 °C for 20 min before its use. The mixture was then vortexed for 5 s, and the obtained suspension was divided in the anaerobic chamber in type 0 gelatin capsules (Cooper, France) with 0.6 mL mixture in each capsule. The gelatin capsules were sterilized under a UV lamp for 15 min before use. After 15 min of solidification, the capsules were closed under anoxic conditions, and their weights were measured.

### 2.5. Morphologic description of formulations by scanning electron microscopy

The morphologies of ALMP beads and the inner part of the gelatin capsules were studied using scanning electron microscopy (SEM) to determine the size, surface and internal structure. Beads or a part of the Gelucire® 43/01 mixture inside the capsules was fixed on a metal stub with double-sided sticky tape and fractured with a scalpel (Swann Morton, England B.S.). Subsequently, the samples were sputter coated with a thin gold layer (100–150 Å) under vacuum using an ion sputter coater (POLARON Thermo VG Scientific, East Grinstead, Sussex, UK) and examined using a SEM FEI La B6 (Eindhoven, Netherlands), at an accelerating voltage of 5 or 10 kV with an electron detector for low vacuum conditions (e.g., equipment available by INRA Dijon, DimaCell Platform).

### 2.6. Viability of bacteria

Cell viability was evaluated on cell concentrates and on formulations after encapsulation and freeze-drying by Colony Forming Unit (CFU) count in anaerobic condition. Except for cell concentrates obtained after centrifugation, some preparatory steps for counting were performed such as rehydration, suspension or recovery of the bacteria. Freeze-dried bacteria were rehydrated with 1 mL degassed culture medium at room temperature. Bacteria encapsulated in ALMP beads and in Gelucire® 43/01 capsules were recovered using the method described by Martin-Dujardin et al. (2013) [13]. For the recovery of the bacteria encased in the Gelucire® capsules, one capsule instead of 1 g of beads was used. These capsules were also heated at 50 °C for 15 min to melt the Gelucire®. Then, serial dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ ) were made in degassed PBS. Counting was performed on LYHBHI (Brain-Heart-Infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract, 1 g/L cellobiose, 1 g/L maltose, 0.5 g/L L-cysteine, and 5 mg/L hemin) agar plates, previously passively degassed overnight in an anaerobic chamber. All medium components were from Sigma-Aldrich. The plates were then incubated for two days at 37 °C in an anaerobic environment. All the experiments were done in triplicate. To calculate the survival rates, the numbers of bacteria still alive after being exposed to a condition were divided by the numbers of alive bacteria before exposures and the results were multiplied by hundred.

### 2.7. Stability of bacteria during storage

The formulations were stored in hermetic boxes filled with a  $N_2H_2CO_2$  gaseous mixture for 14 days at room temperature (25 °C), in the absence of light, and at 11% relative humidity. Bacteria viability was checked by counting (see Section 2.6).

### 2.8. Exposure of bacteria to different gastro-intestinal buffers

To study the resistance of fresh and freeze-dried bacteria during human digestion and the protective effects of formulations during this stage, the bacteria were exposed separately to six buffers, each mimicking the environment of one of the digestive tract compartments. The media used followed the European Pharmacopoeia 9.0 guidelines Section 2.9.3 and were the same as those used by Martin-Dejardin et al. (2013) [13]. They are detailed in Table 1. All exposures were carried out inside an anaerobic chamber for 30 min at 37 °C in 10 mL degassed buffer solution. For the fresh and freeze-dried bacteria, the dilutions for counting were performed directly with the buffer solution containing the cells after exposure. For the encapsulated bacteria, the ALMP beads and the Gelucire® capsules were recovered prior to counting as described before.

**Table 1**

Composition of the exposure media used to simulate conditions of the gastro-intestinal tract.

Gastro-intestinal segment	Medium	pH
Stomach	Stimulated gastric fluid with 3 g/L pepsin	1.8
Proximal jejunum	Phosphate buffer	6.4
Distal jejunum	Phosphate buffer with 5 g/L pancreatin and 3 g/L bile salts	6.8
Proximal ileum	Phosphate buffer	7.2
Distal ileum	Phosphate buffer	7.4
Colon	Phosphate buffer with 3.5 g/L pectinase	6.0

### 2.9. Statistical analysis

All findings obtained were analysed statistically with the R software (R Development Core Team, 2008). The effects of encapsulation, freeze-drying and buffers exposures on bacteria viability were evaluated by analysis of variance. P levels  $\leq 0.05$  were considered significant. Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) tests were also performed to detect significant differences.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Exposure of fresh and freeze-dried, non-encapsulated bacteria to gastro-intestinal buffers

The resistance of *F. prausnitzii* to buffers mimicking the digestive tract compartments was investigated to determine whether bacteria could reach the intestine alive without specific protection. This experiment was performed with fresh and freeze-dried bacteria, and the findings are presented in Fig. 1. After contact with the stomach and the distal jejunum buffers, complete viability loss of both fresh and freeze-dried bacteria was observed. That suggests that *F. prausnitzii* is highly sensitive to these two compartmental environments. These results can be explained by the extremely acidic pH of the stomach buffer (pH 1.8) and the presence of bile salts in the distal jejunum buffer, because it is known that *F. prausnitzii* cannot grow at a pH value less than 4.5 and is highly sensitive to bile salts [14]. Concerning the buffers mimicking the proximal jejunum, the proximal ileum, the distal ileum and the colon, no viability loss was observed after exposing fresh bacteria for 30 min. For the freeze-dried bacteria, 5 log<sub>10</sub> losses were obtained for each buffer. These losses correlate with the length of time the bacteria stayed in the various buffers. Indeed, freeze-drying weakens bacteria, and the nature of the buffer used during the rehydration stage is a key parameter to improve their survival [15,16]. In our study, bacteria were rehydrated and exposed for 30 min to gastro-intestinal buffers without nutrients that could help them recover. Therefore, it is not surprising to observe cell death during this stage for the freeze-dried bacteria. In any case, the results show that it is unlikely that *F. prausnitzii* reaches the colon without protection. Dried bacteria are required for producing commercial dosage forms that will be stored at ambient temperature [17]. That is why the continuation of this study was performed with freeze-dried bacteria. Moreover, a solid or a powder allows obtaining solid dosage forms as capsules.

### 3.2. Impact of the encapsulation process and storage on the viability of bacteria

#### 3.2.1. Encapsulation in ALMP beads

The bacteria were encapsulated by ionotropic gelation using the extrusion method with ALMP as biopolymer. The extrusion method was chosen mainly because it can be done in anaerobic conditions, as previously mentioned. ALMP was selected because it is a food grade polysaccharide already used in different microencapsulation techniques to deliver drugs or bacteria to the colon [10,18,19]. In our experiment,

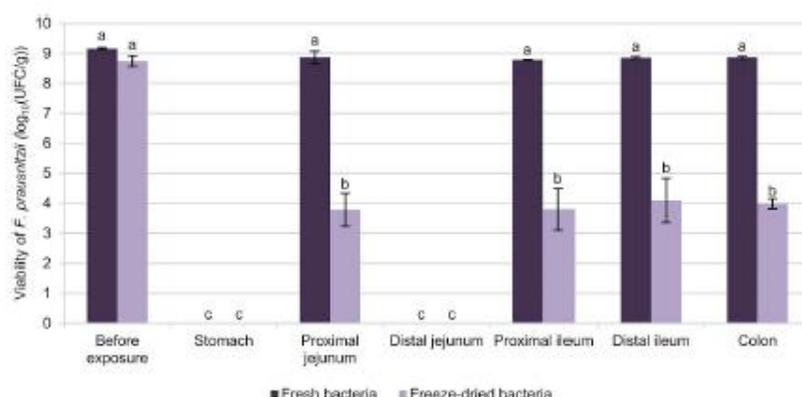


Fig. 1. Viability of fresh and freeze-dried non-encapsulated bacteria after exposure to buffers mimicking the digestive tract compartments (n = 3, P ≤ 0.05). The letters represent the statistical groups obtained by a Tukey's HSD test.

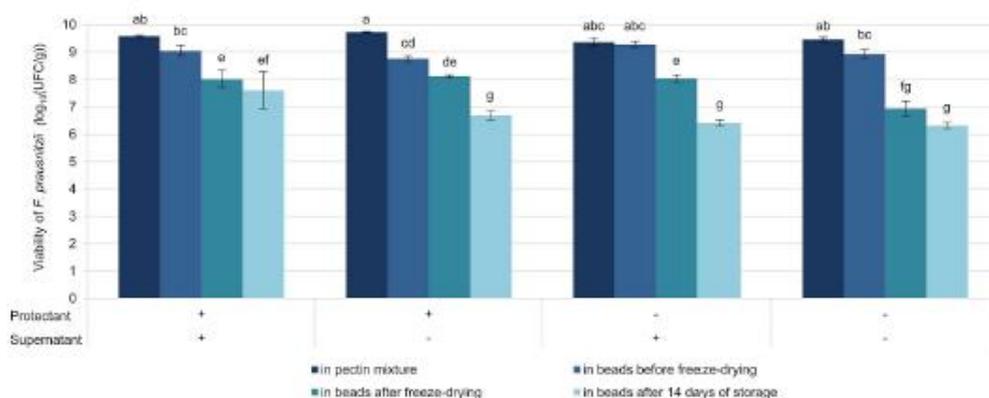


Fig. 2. Influence of the gelling solution formulation on the formation of calcium-amidated low-methoxyl pectin beads containing extremely oxygen-sensitive bacteria by the extrusion method (n = 3, P ≤ 0.05). The letters represent the statistical groups obtained by a Tukey's HSD test.

four gelling solutions containing the same amount of CaCl<sub>2</sub> (2% (w/v)) were tested, and the results are presented in Fig. 2. The CaCl<sub>2</sub> was dissolved in PBS with supernatant and protectants (++) for the first solution, in PBS with protectants for the second one (+-), in PBS with supernatant for the third one (-+) and in PBS without protectants and supernatant for the last solution (-).

Whatever formulation tested, beads with bacteria entrapped inside

were obtained, as can be seen in Fig. 3 A, which represents the inner structure of ALMP beads observed by SEM. The holes in the matrix of the beads are also clearly visible in this image confirming the cabbage-like structure obtained after freeze-drying and resulting from the sublimation of the water initially entrapped inside the beads. No statistical differences were observed between the CFU levels before encapsulation (Fig. 2). Regarding the encapsulation efficiencies, they are 32 ± 13%

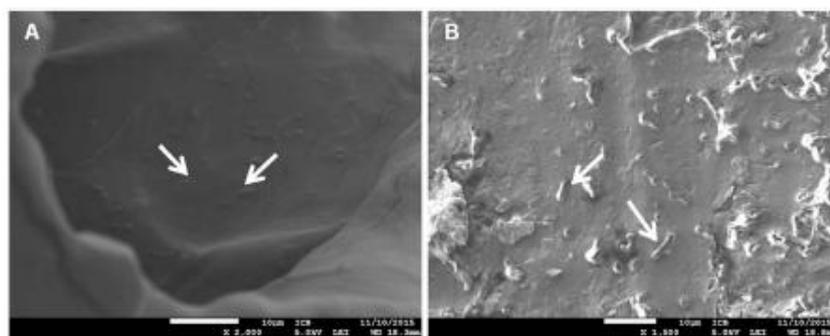


Fig. 3. Scanning electron microscopy pictures of (A) the inner structure of calcium-amidated low-methoxyl pectin beads and (B) the inner structure of gelatin capsules filled with Gelucire® 43/01. The arrows indicate the entrapped bacteria. The samples were measured at 5 kV with a magnification of 1500 or 2000X.

**Table 2**

Comparison of viabilities of *F. prausnitzii* in calcium-amidated low-methoxyl pectin beads and in gelatin capsules filled with Gelucire® 43/01 (n = 3, P < 0.05). The letters represent the statistical groups obtained by a Tukey's HSD test.

	Calcium - ALMP	Gelucire® 43/01
Cells mixture before encapsulation and freeze-drying (log <sub>10</sub> (CFU/mL))	9.9 ± 0.04 a	9.9 ± 0.03 a
Dosage form (log <sub>10</sub> (CFU/g))	8.0 ± 0.31 b	7.8 ± 0.08 b
Storage during 14 days (log <sub>10</sub> (CFU/g))	7.6 ± 0.66 b	5.5 ± 0.03 c

for the beads made with supernatant and protectants, 11 ± 2% for those made only with protectants, 90 ± 44% for those made only with supernatant and 33 ± 16% for those made without supernatant and protectants. These efficiencies are low compared to those commonly obtained for encapsulation with extrusion method [20,21], except for the beads made only with supernatant. These low encapsulation efficiencies could indicate that a part of the cell population was lost in the gelling solution and not entrapped in the beads [22]. The protocol that we tested could therefore be improved to increase the encapsulation rates by bringing them to those conventionally obtained to increase CFU levels inside beads.

The best survival rate after freeze-drying and storage was obtained for the gelling solution composed of PBS, protectants and supernatant (+ +). This higher viability is related to the presence of sucrose and L-cysteine inside the protectant solution. Indeed, sucrose is widely known to protect a multitude of bacterial species during freezing, freeze-drying and storage. Its protective effect is generally assigned to its capacity to replace water and to form a glassy structure allowing the stabilization of the bacterial membranes, preventing protein denaturation [23–25]. The L-cysteine is also a well-known antioxidant that protects anaerobic bacteria during the freezing step [26], and it has already been shown to improve the survival of anaerobic bacteria during encapsulation by the extrusion method [13]. Moreover, L-cysteine has already been used to improve the survival of encapsulated anaerobic bacteria during storage [27] and has stabilized *F. prausnitzii* over time [28]. The supernatant also seems to have a protective effect on bacterial survival. This protective effect could be due to certain compounds in the culture medium, especially the plant peptones. Indeed, it is known that proteins can be good oxygen and moisture barriers [27], and it has been shown that vegetal peptones can improve the viability of encapsulated dried bacteria during storage [21,29]. Therefore, we used PBS, supernatant and protectants as gelling solutions for the following experiments.

In our study, the best survival rate of bacteria after the freeze-drying was 23%. This value is slightly lower than the 40% obtained by Bircher et al. (2018) [30]. However, even if the process needs to be optimized, this difference in bacterial viability could in part be explained by the fact that the bacteria were freeze-dried in Ca-pectin beads. Indeed, polysaccharides do not offer good protection during freezing or freeze-drying [31], and it has been demonstrated that freeze-drying bacteria immobilized in Ca-alginate beads without a protective solution can strongly affect the survival rate of the encapsulated bacteria [32]. The reason could be related to the moisture content of the Ca-alginate beads containing freeze-dried bacteria that is higher than that of freeze-dried bacteria powder. Thus, the total moisture content of the Ca-ALMP beads could be higher than that of freeze-dried bacteria powders [32–34]. This could affect the survival of the encapsulated bacteria during the freeze-drying step and therefore explain, in part, the low survival rates. However, after this stage, Ca-ALMP beads still contained a CFU/g level greater than 10<sup>8</sup>. Thus, these results suggest that optimization of the freeze-drying and encapsulation steps could result in CFU rates close to or greater than 10<sup>9</sup>, the minimum number of viable cells necessary to consume per day to observe a probiotic effect [35,36].

### 3.2.2. Encapsulation in gelatin capsules filled with Gelucire® 43/01

Gelucire® 43/01 was selected because it is a highly hydrophobic waxy solid, mainly made of triglyceride esters of fatty acids (C<sub>8</sub> to C<sub>18</sub>)

and has a low melting point (around 43 °C). In addition, it has been used to protect active pharmaceutical ingredients from oxygen, light and humidity, and to orally deliver highly water-soluble drugs [37,38]. However, to our knowledge, this kind of encapsulation has never been done with bacteria. More generally, no lipid base has, to our knowledge, been used to encapsulate bacteria by inclusion. Only beeswax has already been used to film alginate beads [39].

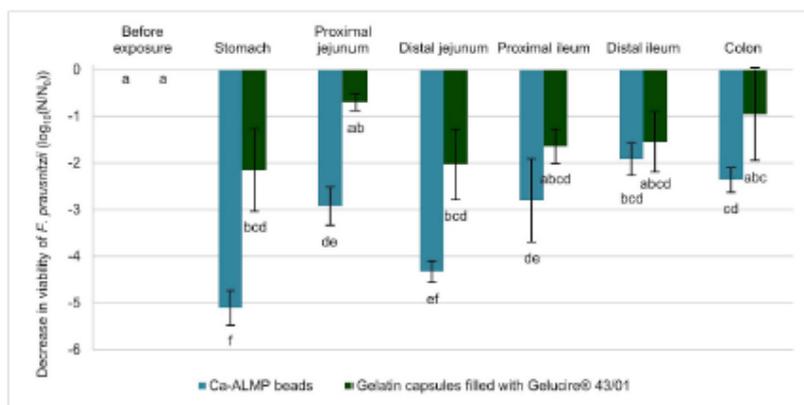
After verification of the morphology by SEM after the encapsulation process, it was confirmed that bacteria were entrapped in the lipid matrix and were evenly distributed inside (Fig. 3 B). The encapsulation process itself decreased bacterial viability by about 2 log<sub>10</sub> (Table 2). This decrease can be explained by the fact that the bacteria were mixed with melted Gelucire® at 70 °C. Indeed, the optimal temperature for *F. prausnitzii* growth is around 37 °C [40]. Thus, although dried bacteria are less thermosensitive than fresh bacteria and the exposition time was short, it is very likely that the contact of freeze-dried bacteria with Gelucire® at 70 °C resulted in partial cell death. Nevertheless, not all loss can be attributed to the encapsulation process itself. Indeed, to count the bacteria, the capsules were heated again at 50 °C for a few minutes to separate the cells from the Gelucire®. As mentioned before, this temperature is not suitable for *F. prausnitzii*, and a significant part of the observed cell death might be due to this step, which is difficult to avoid in our experimental protocol. *In vivo*, this loss will not occur because the release of bacteria will be carried out by digestive enzymes at 37 °C [41]. Because the release step resulted in cell death, the final capsules would actually contain more viable bacteria than the 7.2 × 10<sup>7</sup> CFU/g counted with this method (approximately 4.2 × 10<sup>7</sup> CFU/capsule because a capsule weighs about 0.6 g).

Concerning storage, 5.5 log<sub>10</sub> bacteria remained alive after 14 days, and this formulation cannot stabilize viable bacteria over time. Two hypotheses could explain this result. First, the bacteria are homogeneously dispersed in Gelucire®, and some bacteria are on the surface of the lipid structure where they would be less protected from external conditions. Second is related to the hydrophobic nature of Gelucire® components which were in contact with bacteria after the inclusion process. Consequently, as a result of their lipophilic character, Gelucire® components could partition into the hydrophobic core of membranes. This phenomenon could destabilize the bacterial membrane by a mechanism analogous to that involved in the antimicrobial effect of hydrophobic agents such as thymol or lactone [42,43]. We have currently no evidence that supports one hypothesis more than the other.

### 3.3. Exposure of encapsulated bacteria to gastro-intestinal buffers

#### 3.3.1. Protective effects of Ca-ALMP beads

To evaluate the protective effect of the Ca-ALMP beads on commensal gut bacteria, the beads were exposed to buffers that mimic one of the digestive tract compartments. The results are presented in Fig. 4. The survival of the entrapped cells decreased in each buffer. However, this formulation increased the survival of freeze-dried bacteria in each buffer compared with non-encapsulated bacteria, particularly in the stomach and the distal jejunum buffers (cf. Fig. 1). These results are in agreement with the fact that microencapsulation of bacteria in Ca-ALMP beads protects bacteria during digestion, particularly from the acidic pH of the stomach and from bile salts [44]. The fact that beads made of ALMP associated with calcium are stable in solutions with low



**Fig. 4.** Viability of encapsulated bacteria in calcium-amidated low-methoxyl pectin beads and encapsulated bacteria in gelatin capsules filled with Gelucire® 43/01 after exposure to buffers mimicking digestive tract compartments ( $n = 3$ ,  $P \leq 0.05$ ). Control samples correspond to "Before Exposure":  $N = N_0$ . The letters represent the statistical groups obtained by a Tukey's HSD test.

pH and can resist extensive hydration could explain these results [19,45].

Nevertheless, important losses of survival were observed, from 2 to 5  $\log_{10}$  depending on the mimicking buffers used. The porosity of the Ca-ALMP beads due to the freeze-drying process and their swelling behaviour in aqueous medium could explain, in part, these losses, because a significant part of the encapsulated bacteria was released inside the buffer media during the exposure tests [46–49]. Therefore, counting was performed only on the bacteria still encapsulated in the beads, and the results may have been underestimated. Therefore, the chances that enough viable bacteria encapsulated in Ca-ALMP beads reach the colon are slim. Moreover, the oxygen present in the digestive tract, in the stomach, and at the beginning of the small intestine will also have a significant negative impact on the survival of bacteria [50].

Even if the degree of bacterial loss was high in our experiment, changes in the composition of the beads could significantly increase the number of bacteria delivered to the colon in a viable and functional state. Indeed, it has been demonstrated that the addition of alginate to pectin protects more bacteria during the transit step than pectin alone [44,47]. Other compounds such as starch, and a mixture of gelatin and alginate or rice-bran [46,51,52] could also be used. Coating beads with whey proteins could also be considered because it is known that coating pectin beads with these proteins increases bacterial survival after exposure to gastro-intestinal conditions [53,54]. A change of calcium to zinc as an alternative cross-linker to obtain a stronger pectinate network could also improve the stability of the beads in the upper gastro-intestinal tract [55,56].

### 3.3.2. Protective effects of gelatin capsules filled with Gelucire® 43/01

The protective effects were evaluated in the same way as for the Ca-ALMP beads, and the results are also presented in Fig. 4. The formulations exposed to the buffers mimicking the proximal jejunum, the proximal ileum, the distal ileum and the colon showed statistically no loss of viability after exposure. The formulations exposed to the stomach and proximal jejunum buffers, the most lethal gastro-intestinal tract compartments for *F. prausnitzii* (cf. Fig. 1), only showed a loss of approximately 2  $\log_{10}$ . These results demonstrate that Gelucire® 43/01 efficiently protects bacteria during the transit steps because it is highly hydrophobic (Hydrophilic-Lipophilic Balance value of 1) and very resistant to fractures, erosion and swelling, thanks to its lipid composition [37,57]. Therefore, the rehydration of bacteria could be extremely limited and could take a lot of time.

### 3.4. Comparison of formulations

Our results indicate that the Ca-ALMP beads can stabilize bacteria for a few weeks, unlike capsules filled with the lipid base Gelucire® 43/

01. Nevertheless, although these beads partially protect the bacteria during their exposure to the different buffers mimicking the gastro-intestinal tract, their protective effect seems not sufficient to allow the delivery of enough bacteria to the colon to observe a therapeutic effect. In contrast, the capsules filled with Gelucire® 43/01 protect the bacteria well during the *in vitro* exposure tests and could deliver a high number of bacteria to the intestine, but the bacteria encapsulated in this way are not stable over time.

Nevertheless, it is important to notice that none of the few studies on formulations containing commensal gut bacteria demonstrated both stabilizing the bacteria and protecting them from the conditions of the gastro-intestinal tract. For example, van der Ark et al. (2017) succeeded in encapsulating *A. muciniphila* in a double water-oil-water emulsion and in protecting these bacteria effectively during their passage in the digestive tract, but, this encapsulation process did not allow stabilizing them more than a few hours for storage [9]. Allouche et al. (2018) stabilized *F. prausnitzii* efficiently for one month by direct compression [8]. However, because of the absence of a protective strategy to defend the bacteria against the conditions of the gastro-intestinal tract and to the properties of the excipients (e.g. microcrystalline cellulose), these formulations disintegrated too quickly when they came into contact with water, which suggests that bacteria will not reach the intestine alive. Thus, these processes, although promising, also need to be optimized.

## 4. Conclusion

This study demonstrates that non-encapsulated *F. prausnitzii*, a commensal gut probiotic bacterium, does not survive in buffers mimicking the stomach or the distal jejunum environment. To improve the delivery of these bacteria in a viable and functional state to the intestine, an encapsulation process consisting of entrapping dried bacteria in a highly hydrophobic lipid base (Gelucire® 43/01) was developed. The formulations were compared with others made by extrusion with ALMP. The results show that the two processes protect commensal gut bacteria from the stomach and distal jejunum media during exposure. However, the protective effects obtained by ionotropic gelation with ALMP are weak compared with those obtained with the inclusion of bacteria in Gelucire® 43/01, even if the ionotropic gelation permits stabilization of encapsulated bacteria for 14 days after encapsulation. Hence, encapsulating commensal gut probiotic bacteria with a highly hydrophobic matrix seems to be a promising strategy to provide sufficient digestive protection for these bacteria and to permit their clinical use. Currently, work is in progress to combine the advantages of both processes (protection and stabilization), and further studies are needed to evaluate the delivery of these encapsulated bacteria to the intestine and to check their functionalities.

### CRedit authorship contribution statement

**Audrey Raïse:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **Sébastien Dupont:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - original draft, Funding acquisition. **Cyril Iaconelli:** Methodology, Investigation. **Christian Caliri:** Investigation. **Alexandre Charriau:** Investigation. **Patrick Gervais:** Supervision. **Odile Chambin:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - original draft. **Laurent Beney:** Conceptualization, Supervision, Writing - original draft, Funding acquisition.

### Declaration of competing interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté; the 'Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)'; and the French National Research Agency (ANR) for funding the DOPEOS project.

We would like to thank Aline Bonnotte (Plateforme DimaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne-Franche-Comté, AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France) who was in charge of SEM.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101608>.

### References

- [1] D.C. Savage, Microbial ecology of the gastrointestinal tract, *Annu. Rev. Microbiol.* 31 (1977) 107–133, <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.000543>.
- [2] D. Li, P. Wang, P. Wang, X. Hu, F. Chen, The gut microbiota: a treasure for human health, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 1210–1224, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.003>.
- [3] J. Xu, J.I. Gordon, Honor thy symbionts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 10452–10459, <https://doi.org/10.1073/pnas.1734063100>.
- [4] H. Sokol, B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdar, L.G. Bermúdez-Humarán, J.-J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J.-P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H.M. Blottière, J. Doré, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella, Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 16731–16736, <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>.
- [5] M. Derrien, C. Belzer, W.M. de Vos, Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions, *Microb. Pathog.* 106 (2017) 171–181, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>.
- [6] K. Machtelds, M. Joossens, J. Sabino, V. De Preter, I. Arijs, V. Eeckhaut, V. Ballet, K. Claes, F. Van Immerseel, K. Verbeke, M. Ferrante, J. Verhaegen, P. Rutgeerts, S. Vermetre, A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis, *Gut* 63 (2014) 1275–1283, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304833>.
- [7] P.W. O'Toole, J.R. Marchesi, C. Hill, Y.C. Na, H.S. Kim, Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics, *Nat. Microbiol.* 2 (2017) 17057, <https://doi.org/10.1038/natmicrobiol.2017.57>.
- [8] R. Allouche, S. Dupont, A. Charriau, P. Gervais, L. Beney, O. Chambin, Optimized tableting for extremely oxygen-sensitive probiotics using direct compression, *Int. J. Pharm.* 538 (2018) 14–20, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.010>.
- [9] K.C.H. van der Ark, A.D.W. Nugroho, C. Berton-Carabin, C. Wang, C. Belzer, W.M. de Vos, K. Schronen, Encapsulation of the therapeutic microbe *Akkermansia muciniphila* in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions, *Food Res. Int.* 102 (2017) 372–379, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.004>.
- [10] M.J. Martín, F. Lara-Villoslada, M.A. Rutz, M.E. Morales, Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects, *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 27 (2015) 15–25, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>.
- [11] J. Burgain, C. Galani, M. Linder, J. Scher, Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications, *J. Food Eng.* 104 (2011) 467–483, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>.
- [12] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *Int. Dairy J.* 13 (2003) 3–13, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3).
- [13] F. Martin-Dejardin, B. Ebel, G. Lemetals, H. Nguyen Thi Minh, P. Gervais, R. Cachon, O. Chambin, A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 49 (2013) 166–174, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.015>.
- [14] C. Foditsch, T.M.A. Santos, A.G.V. Teixeira, R.V. V. Pereira, J.M. Dias, N. Gaeta, R.C. Bicalho, Isolation and characterization of faecalibacterium prausnitzii from calves and piglets, *PLoS One* 9 (2014) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116465>.
- [15] C. Schwab, R. Vogel, M.G. Gänzle, Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying, *Cryobiology* 55 (2007) 108–114, <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.004>.
- [16] G.F. De Valdez, G.S. De Giori, A.P. De Ruiz Holgado, G. Oliver, Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria, 50, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 1339–1341, <https://doi.org/10.1128/aem.50.6.1339-1341.1985>.
- [17] I. Jankovic, W. Sybesma, P. Phothirath, E. Anania, A. Mercener, Application of probiotics in food products—challenges and new approaches, *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (2010) 175–181, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.009>.
- [18] A.B. Shori, Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit, *HAYATI J. Biosci.* (2017) 8–12, <https://doi.org/10.1016/j.hyb.2016.12.008>.
- [19] P. Sriramomsak, S. Sunghongjeen, S. Puttipatkhachorn, Use of pectin as a carrier for intragastric floating drug delivery: carbonate salt contained beads, *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 436–445, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.013>.
- [20] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth, The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria, *Int. Dairy J.* 14 (2004) 737–743, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.01.004>.
- [21] M. Xu, F. Gagné-Bourque, M.J. Dumont, S. Jabaji, Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions, *J. Food Eng.* 168 (2016) 52–59, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.021>.
- [22] A. Ainsley Reid, J.C. Vuilleumard, M. Britten, Y. Arand, E. Farnworth, C.P. Champagne, Microencapsulation of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 603–619, <https://doi.org/10.1080/02652040500162840>.
- [23] Z. Hubálek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology* 46 (2003) 205–229, [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4).
- [24] A.S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F.X. Malcata, P. Gibbs, Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.* 14 (2004) 835–847, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.001>.
- [25] S.B. Leslie, E. Israelit, B. Lighthart, J.H. Crowe, L.M. Crowe, Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3592–3597.
- [26] S. Sousa, A.M. Gomes, M.M. Pintado, F.X. Malcata, J.P. Silva, J.M. Sousa, P. Costa, M.H. Amaral, D. Rodrigues, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Freitas, Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures, *Eng. Life Sci.* 12 (2012) 457–465, <https://doi.org/10.1002/elsc.201200007>.
- [27] D. Rodrigues, S. Sousa, T. Rocha-Santos, J.P. Silva, J.M. Sousa Lobo, P. Costa, M.H. Amaral, M.M. Pintado, A.M. Gomes, F.X. Malcata, A.C. Freitas, Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules, *Int. Dairy J.* 21 (2011) 869–876, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.005>.
- [28] M.T. Khan, J.M. Van Dyl, H.J.M. Harmsen, Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* alive at ambient air, *PLoS One* 9 (2014) e96097, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096097>.
- [29] C. González-Ferrero, J.M. Irache, C.J. González-Navarro, Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance, *Food Chem.* 239 (2018) 879–888, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.022>.
- [30] I. Bircher, A. Geirnaert, F. Hammes, C. Lacroix, C. Schwab, Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes, *Microb. Biotechnol.* 11 (2018) 721–733, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13265>.
- [31] G.F. De Valdez, G.S. De Giori, A.P. De Ruiz Holgado, G. Oliver, Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 413–415.
- [32] C.P. Champagne, N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen, C. Lacroix, The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*, *Food Res. Int.* 25 (1992) 419–427, [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90166-3](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90166-3).
- [33] C.P. Champagne, N.J. Gardner, The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying, *Electron. J. Biotechnol.* 4 (2001) 146–152, <https://doi.org/10.2225/vol4-issue3-fulltext-4>.
- [34] B. De Gualto, P. Orlando, G. Barba, R. Coppola, M. De Rosa, A. Sada, P.P. De Prisco, F. Nazzaro, Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2005) 739–746, <https://doi.org/10.1007/s11274-004-4735-2>.
- [35] C. Hill, F. Guamer, G. Reid, G.R. Gibson, D.J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R.B. Canani, H.J. Flint, S. Salminen, P.C. Calder, M.E. Sanders, Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11 (2014) 506–514, <https://doi.org/10.1038/>

- ngastro.2014.66.
- [36] S. Hematswarya, R. Raja, R. Ravikumar, I.S. Carvalho, Mechanism of action of probiotics, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56 (2013) 113–119, <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100015>.
- [37] K.C. Panigrahi, C.N. Patra, G.K. Jena, D. Ghose, J. Jena, S.K. Panda, M. Sahu, Gelucire: a versatile polymer for modified release drug delivery system, *Future J. Pharm. Sci.* 4 (2018) 102–108, <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.11.001>.
- [38] B. Chauhan, S. Shimpi, K.R. Mahadik, A. Paradkar, Preparation and evaluation of floating risedronate sodium-gelucire® 43/01 formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 851–860, <https://doi.org/10.1080/03639040500271837>.
- [39] S. Mandal, S. Hati, A.K. Punjya, K. Khamrui, K. Singh, Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298, *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 1994–2001, <https://doi.org/10.1002/jsfa.6514>.
- [40] S.H. Duncan, G.L. Hold, H.J.M. Harmsen, C.S. Stewart, H.J. Flint, Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 2141–2146, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02241-0>.
- [41] S. Fernandez, J.D. Rodier, N. Ritter, B. Mahler, F. Demarne, F. Carrière, V. Jannin, Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire® 44/14 by digestive lipases, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1781 (2008) 367–375, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.05.006>.
- [42] D. Trombetta, F. Castell, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2474–2478, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>.
- [43] M. Aguedo, L. Beney, Y. Waché, J.M. Belin, Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells, *J. Appl. Microbiol.* 94 (2003) 258–265, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01828.x>.
- [44] O. Sandoval-Castilla, C. Lobato-Calleiros, H.S. García-Galindo, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter, Textural properties of alginate-pectin beads and survival of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt, *Food Res. Int.* 43 (2010) 111–117, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>.
- [45] L.S. Liu, M.L. Fishman, J. Kost, K.B. Hicks, Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route, *Biomaterials* 24 (2003) 3333–3343, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00213-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00213-8).
- [46] A. Dafe, H. Etemadi, A. Dilmaghani, G.R. Mahdavi, Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria, *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 536–543, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.060>.
- [47] M. Bekhit, I. Sánchez-González, G. Ben Messaoud, S. Desobry, Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on alginate/pectin composite microbeads: effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release, *J. Food Eng.* 180 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.031>.
- [48] S. Jaya, T.D. Durance, R. Wang, Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules, *J. Microencapsul.* 26 (2009) 143–153, <https://doi.org/10.1080/02652040802211345>.
- [49] P. Sriamornsak, S. Puttipitakachorn, S. Prakongpan, Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads, *Int. J. Pharm.* 156 (1997) 189–194, [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00192-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00192-0).
- [50] M.G. Espey, Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota, *Free Radic. Biol. Med.* 55 (2013) 130–140, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.554>.
- [51] A.S. Vaziri, I. Alemzadeh, M. Vossoughi, A.C. Khorasani, Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites, *Carbohydr. Polym.* 199 (2018) 266–275, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.002>.
- [52] A. Chotiko, S. Sathivel, Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran-extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions, *IWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)* 66 (2016) 420–427, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.058>.
- [53] C. Gebara, K.S. Chaves, M.C.E. Ribeiro, F.N. Souza, C.R.F. Grosso, M.L. Gigante, Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions, *Food Res. Int.* 51 (2013) 872–878, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.008>.
- [54] C.L. Gerez, G.F. de Valdez, M.L. Gigante, G.R.F. Grosso, Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR1 1505 to low pH, *Leit. Appl. Microbiol.* 54 (2012) 552–556, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03247.x>.
- [55] I. El-Gibaly, Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery, *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 199–211, [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00903-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00903-6).
- [56] O. Chamin, G. Dupuis, D. Champton, A. Voilley, Y. Pourcelet, Colon-specific drug delivery: influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance, *Int. J. Pharm.* 321 (2006) 86–93, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.015>.
- [57] W. Sutananta, D.Q.M. Craig, J.M. Newton, An evaluation of the mechanisms of drug release from glyceride bases, *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1995) 182–187, <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb05775.x>.



## Effect of devitrification on the survival and resistance of dried *Saccharomyces cerevisiae* yeast

Pauline Ribert<sup>1,2</sup> · Sébastien Dupont<sup>1</sup> · Gaëlle Roudaut<sup>1</sup> · Laurent Beney<sup>1</sup>

Received: 14 June 2021 / Revised: 5 July 2021 / Accepted: 6 July 2021 / Published online: 23 August 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Yeasts are anhydrobiotes that accumulate large amounts of trehalose, which is involved in the vitrification of the cytoplasm during drastic desiccation. The effect of devitrification, which can be induced by the transient exposure of desiccated yeasts to increased humidity or elevated temperature, on the survival of yeast has been studied. A glass transition temperature ( $T_g$ )/water activity ( $a_w$ ) diagram of yeast was constructed based on differential scanning calorimetry analysis. The survival rate of yeasts that were equilibrated at different relative humidities (RHs) and temperature values over their  $T_g$  range was measured. The results revealed a long period of cell preservation at an intermediate RH (55%), with 100% survival observed after 3 months, a loss of 1.24 log colony-forming units/g recorded after 1 year at 25 °C and full preservation of viability at 75 °C for 60 min and at 100 °C and 12% RH for up to 10 min. These findings led us to conclude that dried yeast can resist low or intermediate RH values and elevated temperatures in the devitrified state. Considering the thermal and humidity fluctuations occurring in the yeast environments, we hypothesized that the supercooled state, which occurs immediately above the  $T_g$  after rehydration or heating, is a protective state that is involved in the persistence of yeasts at intermediate humidity levels.

### Key points

- Yeast survival for months in a supercooled state is observed at room temperature.
- Dried yeasts survive a 10-min exposure to 100 °C in the supercooled state.
- The supercooled state is suitable for yeast preservation.

**Keywords** Active dry yeast · Water activity · Glass transition · Supercooled state · Devitrification · Trehalose

### Introduction

Humidity fluctuations caused by seasonal and environmental changes are continuously occurring in the environment. Some organisms, called anhydrobiotes, have adapted and are able to survive periods of intense drought via temporary suspension of the cellular metabolism, until the return of favorable conditions. The key mechanisms that explain the survival of anhydrobiotic organisms have been reported and are notably linked to the accumulation of trehalose, which is a non-

reducing disaccharide with specific physico-chemical properties (Eleutherio et al. 1992; Aguilera and Karel 1997; Tapia et al. 2015; Gélinas 2019). As water is essential to structural biomolecules and molecular assemblies, such as proteins and membranes, its removal causes drastic structural changes in living organisms. Therefore, desiccation without compensation of this structuring effect is often lethal (Dupont et al. 2014; Rapoport et al. 2019). Trehalose and other disaccharides can substitute for water by polar interactions with biomolecules that allow them to maintain their structure in the dried state (Carpenter and Crowe 1989; Leslie et al. 1994). This specificity led to the development of the “water replacement theory” by Crowe and collaborators (Clegg et al. 1982; Crowe et al. 1998b). As water location studies in dried proteins revealed the presence of a hydration layer at the protein/trehalose interface, a stabilizing role was proposed for trehalose based on its ability to maintain this superficial hydration layer, i.e., the “water entrapment theory”

✉ Laurent Beney  
lbeney@u-bourgogne.fr

<sup>1</sup> Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Phileo by Lesaffre, Marcq en Baroeul, France

(Belton and Gil 1994). Recent studies also revealed that trehalose can mobilize a high number of water molecules compared with other sugars (Lerbret et al. 2011).

The protective role of trehalose during desiccation also lies in its glass formation capacity. Glass exhibits the mechanical properties of solids and is distinct from crystal because of the lack of molecular order. The high glass transition temperature ( $T_g$ ) of trehalose compared with sucrose and maltose (Green and Angell 1989; Crowe et al. 1998a) eases the glass formation process in tempered environmental conditions. The vitrification process involving trehalose or other oligosaccharides occurs also at sub-zero temperatures in various organisms resistant to freezing (Wright 2001). Nevertheless, in binary systems composed of water and trehalose, glass formation is exceptional because crystal is the form that exist at thermodynamic equilibrium. In such binary systems, glass is a metastable state that is only formed in appropriate kinetic conditions. In the cellular context, vitrification upon drying seems to occur more spontaneously because of molecular and structural crowding, both of which restrain molecular mobility and limit the molecular rearrangement involved in crystallization (Buitink and Leprince 2004).

After vitrification, the cell components are embedded in a glassy amorphous matrix where their molecular movements are slowed down by several orders of magnitude compared with a liquid solution. Thus, the kinetics of cellular chemical and enzymatic reactions are decreased (Buitink and Leprince 2004) and allow the stabilization of biological systems over long-term periods when the dry cells are kept in a glassy state (Sun et al. 1994; Crowe et al. 1998a). In association with industrial know-how, these phenomena permit the production of dry forms of yeast that can both survive for several years in desiccated conditions and restore their metabolic activity within a few minutes after devitrification by rehydration. The maintenance of the glassy state depends on the temperature and the humidity levels of the atmosphere surrounding the dry yeast. Partial humidification or heating promotes the transition from glass to a highly viscous non-crystalline state, which occurs between the  $T_g$  and the melting point and is called the supercooled state (Le Meste et al. 2002). This state is encountered when the product is equilibrated with ambient air at a relative humidity (RH) of about 30–70%. In such conditions, molecular mobility remains limited by the high intracellular concentration compared with fully hydrated conditions, but is by far higher than that observed in the glassy state. Few studies have addressed the stability of microorganisms in this concentrated, albeit non-glassy, state, although it is a significant factor in the technological or natural environments of yeasts, where severe drought remains exceptional and is generally not constant. In such conditions, trehalose is concentrated in cells and can thus exert its water-substitution role, without contributing to glass formation at this hydration level. This state might already constitute a preserving state.

The objective of this study was to test this hypothesis via the investigation of the consequences of hydric and/or thermal devitrification on yeast survival through a long- or short-term temporary excursion into the supercooled state. This study was performed using industrial active dry yeasts (ADYs), which are rich in trehalose and are optimally processed to survive in the dried state. Industrial ADYs were equilibrated at different water activity ( $a_w$ ) and temperature values to control their physical states (glassy or supercooled amorphous states), which were assessed using differential scanning calorimetry (DSC). The evolution over time of the viability of yeasts, in glassy or supercooled states, was assessed to characterize the influence of yeast physical state on cell stability.

## Materials and methods

### Biological samples

The experiments were performed using industrial ADY (called S<sub>0.12</sub>) exclusively composed of yeasts cells (*Saccharomyces cerevisiae*, ActiSaf Sc47 HR+, Phileo by Lesaffre, Lesaffre, Marcq en Baroeul, France, cellular concentration of  $10^{10}$  colony-forming units [CFU]/g of product). The moisture content was 4.4% of total mass and the  $a_w$  was 0.12.

### Determination of trehalose content

Heat shock lysis was performed on the ADY to allow the release of intracellular trehalose. After filtration, the total trehalose of the lysate was determined by high-pressure liquid chromatography. Three replicates were carried out. The trehalose content in ADY was 23% of dry matter.

### Differential scanning calorimetry

The  $T_g$  of equilibrated samples was determined using a DSC on a Q20 calorimeter (TA Instrument, New Castle, DE, USA) under a nitrogen atmosphere at a flow rate of  $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The experiments were carried out using approximately 5–10 mg of sample, which was hermetically sealed in a medium-pressure aluminum pan (Tzero Pan with Tzero Hermetic Lid; TA Instruments, New Castle, DE, USA). An empty pan was used as a reference. The instrument was calibrated at  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  for temperature and energy with azobenzol and indium. Samples were scanned at  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  during both cooling and heating in the temperature range of  $-40$  to  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ . Two heating scans were performed. The first scan was used to erase the thermal history and the possible overshoot associated with enthalpy relaxation, while the second was performed to determine the  $T_g$ . Three replicates were carried out per studied  $a_w$  condition.

### Hydration of ADYs to intermediate $a_w$ for long exposure in a supercooled state

To determine the effect of storage at different physical states on the viability of yeasts, ADYs were equilibrated at different  $a_w$  values. Dishes containing  $1 \pm 0.003$  g of sample at an  $a_w$  of 0.12 ( $S_{0.12}$ ) were stored in hermetic boxes over saturated salt solutions of  $MgCl_2$  (RH, 33%),  $Mg(NO_3)_2$  (RH, 55%), and  $NaCl$  (RH, 75%) at 25 °C to obtain sample at an  $a_w$  of 0.33 ( $S_{0.33}$ ), sample at an  $a_w$  of 0.55 ( $S_{0.55}$ ), and sample at an  $a_w$  of 0.75 ( $S_{0.75}$ ). These  $a_w$  allowed placing the yeasts either in glassy or supercooled state (Fig. 1). The  $a_w$  of yeast was measured on  $1 \pm 0.003$  g of sample using the dew-point method at 25 °C, on an Aqualab Series 3TE instrument (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Viability and  $a_w$  were determined on the initial ADY and after 2 weeks, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, and 1 year of storage. Three independent technical replicates were performed for each analysis and the mean and standard deviation were calculated.

### Hydration of ADYs to intermediate $a_w$ and thermal treatment for exposure in the supercooled state

To determine the effect of life route and physical state on thermal resistance, the ADYs were equilibrated at different  $a_w$  values. Dishes containing  $1 \pm 0.003$  g of sample at an  $a_w$  of 0.12 ( $S_{0.12}$ ) were stored in hermetic boxes under oversaturated salt solutions of  $MgCl_2$  (RH, 33%),  $K_2CO_3$  (RH, 43%), and  $NaCl$  (RH, 75%) at 25 °C, for 7 days to obtain sample at an  $a_w$  of 0.33 ( $S_{0.33}$ ), sample at an  $a_w$  of 0.43 ( $S_{0.43}$ ), and sample at an  $a_w$  of 0.75 ( $S_{0.75}$ ). These  $a_w$  were chosen to place the samples either in the glassy or supercooled state (Fig. 1). The  $a_w$  of ADYs was measured on  $1 \pm 0.003$  g of sample

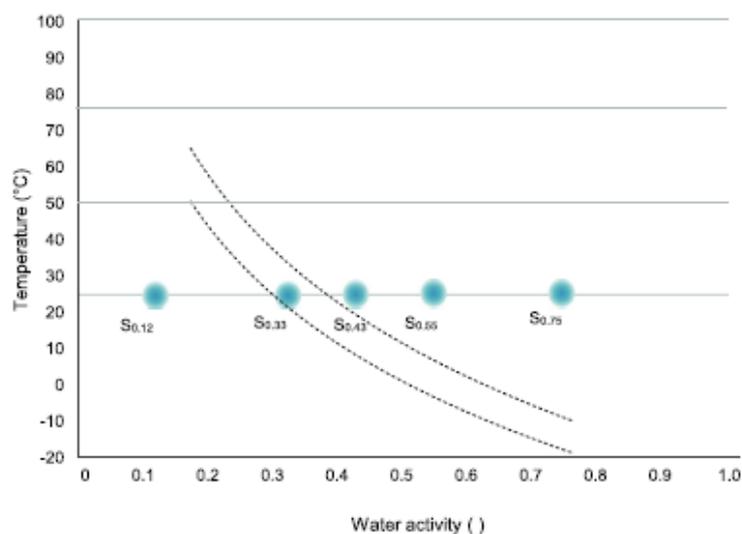
using the dew-point method at 25 °C, on an Aqualab Series 3TE instrument (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Viability and  $a_w$  were determined on the initial ADY. After the equilibrium step, yeasts were vacuum packed. Viability and  $a_w$  were evaluated to verify their impact on the viability of yeasts. Three levels of thermal treatment were applied, i.e., 50 °C, 75 °C (as a moderate heating temperature), and 100 °C (corresponding to a severe temperature), for periods of 10, 30, and 60 min. Heat treatments were carried out in a hot-water bath and three independent replicates were performed. Products were directly heat-treated in their hermetic vacuum bag; thus, we considered that there was no effect on the  $a_w$  of the products.

### Viability measurement

Viability of yeasts was assessed by measuring the ability of yeasts to reproduce and to form colonies on nutritive medium. Active dry yeasts are widely used as probiotics for animals. For this application, the main parameter for the marketing or the study of probiotics is the number of cultivable cells. Cultivability measurements were performed by a drop plate method adapted from (Thomas et al. 2015). For that, successive decimal dilutions were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) from resuspended yeasts solutions containing  $1 \pm 0.003$  g of ADY sample. Subsequently, the dilutions were deposited on yeast mold (YM) medium (YM agar; BD Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). The colonies were counted after incubation for 48 h at 30 °C. The inactivation rates were expressed as  $\log(N/N_0)$  according to the following equation,

$$\log N/N_0 = \log N - \log N_0$$

**Fig. 1** Position of samples  $S_{0.12}$  ( $a_w$ , 0.12),  $S_{0.33}$  ( $a_w$ , 0.33),  $S_{0.43}$  ( $a_w$ , 0.43),  $S_{0.55}$  ( $a_w$ , 0.55), and  $S_{0.75}$  ( $a_w$ , 0.75) at 25 °C according to the ADY phase diagram. The dashed curves represent the beginning and the end of the glass transition. The horizontal lines correspond to the processing temperatures used in this study



where  $N$  is number of CFU/g of product after the equilibrating step and thermal treatment, and  $N_0$  is the number of CFU/g of product before the thermal treatment.

### Determination of the decimal reduction time

The decimal reduction times ( $D$ ) were determined from the viability data at each temperature.  $D$  is the time needed to reduce the population by 90% (i.e., 1 log) for the temperature considered. The kinetics of cell destruction is of order 1; therefore, the following relationship was established

$$N = N_0 \times 10^{-\frac{t}{D}}$$

where  $N$  is the number of CFU/g of product at  $t$  time,  $N_0$  is the number of CFU/g of product at the initial time,  $t$  is the time (s) and  $D$  is the decimal reduction times (expressed in s).

### Statistical analysis

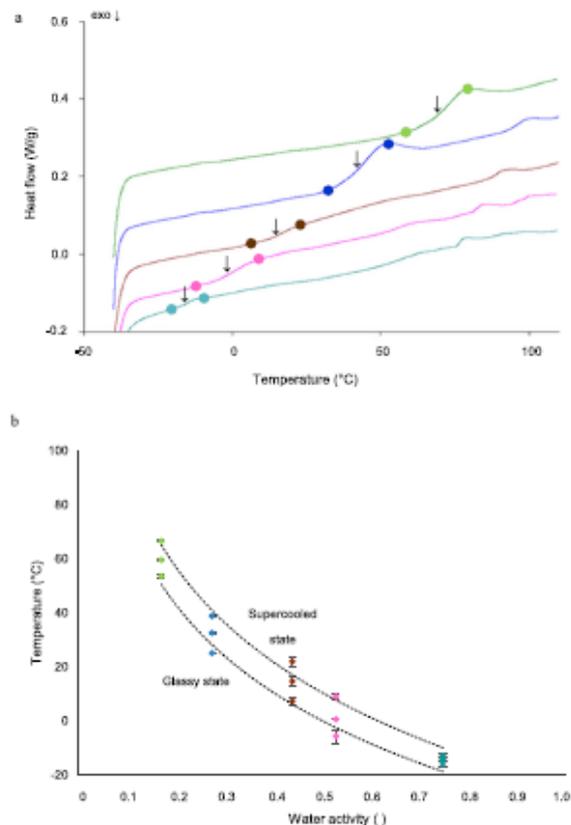
The data from each experiment were statistically processed. The homogeneity of variance ( $F$ -test) was tested, our results revealed a homogeneous variance ( $p > 0.05$ ). A 2-factor ANOVA and a Tukey (HSD) test ( $p < 0.05$ ) were performed to determine whether significant differences existed between the different conditions.

## Results

### Glass transition of ADYs

This study focused on the consequences of hydric and/or thermal devitrification on industrial ADYs according to their hydration level and their life course (hydration and temperature). The structural states of the ADYs were assessed by DSC.

The ADYs were equilibrated at different RH values (12%, 33%, 43%, 55%, and 75% RH). Both the first and second scans of DSC thermograms exhibited typical glass transition patterns (Fig. 2a). The  $T_g$  was determined from the midpoint of the observed heat capacity change to overcome any possible overshoot associated with the enthalpy relaxation present on the thermogram of the first heating scan. The  $T_g$  onset,  $T_g$  midpoint and  $T_g$  endset were measured for each tested RH and the glass transition vs.  $a_w$  is presented in Fig. 2b, where the dotted curves represent the beginning ( $T_g$  onset) and the end ( $T_g$  endset) of the phenomenon. The  $T_g$  values expectedly decreased with increasing  $a_w$ . The  $T_g$  midpoint value was 60 °C at 12% RH, whereas an increase of RH of 30% led to a  $T_g$  value of 13 °C. The phase transition diagram was used to define the  $a_w$ /temperature conditions that induce a transition from the glassy to the supercooled state by crossing the  $T_g$  curve.



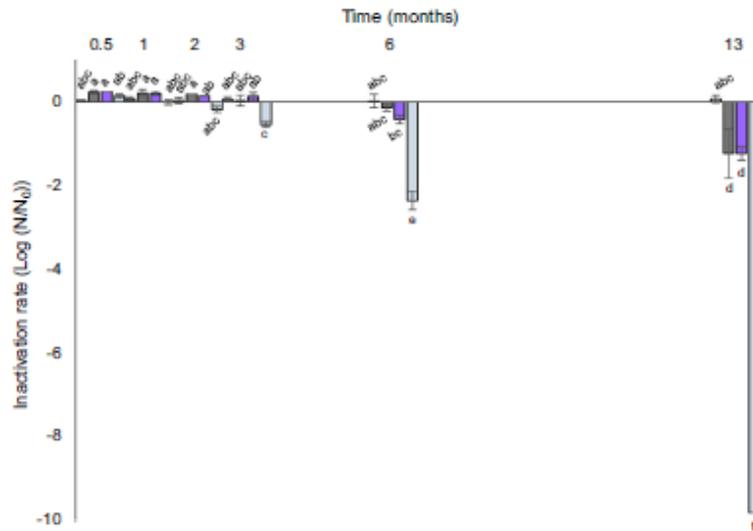
**Fig. 2** Glass transition of ADY hydrated at different RH values. **a** Glass transition curves (first scan) for yeasts for 12% RH (■); 33% RH (■), 43% RH (■), 55% RH (■), and 75% RH (■). The points show the beginning (onset) and the end (endset) of the glass transition. The solid arrows show the midpoint of the glass transition. **b** Mean values of  $T_g$  (onset, midpoint and endset) of the hydrated samples at 12% RH (●), 33% RH (●), 43% RH (●), 55% RH (●), and 75% RH (●) on the temperature vs  $a_w$  diagram. Standard deviations are presented. The dotted curves represent the beginning and the end of the glass transition phenomenon.

### Long exposure of hydrated yeasts to intermediate $a_w$ in the supercooled state at room temperature: persistence of viability over time

We studied the evolution of the viability of rehydrated ADY at intermediate  $a_w$  above the  $T_g$  for 1 year. The ADYs ( $S_{0.12}$ ) were equilibrated at different RH values, leading to samples  $S_{0.33}$  ( $a_w$ , 0.33),  $S_{0.55}$  ( $a_w$ , 0.55),  $S_{0.75}$  ( $a_w$ , 0.75). They were stored for 1 year under controlled conditions (25 °C, no convection, in the dark).

$S_{0.12}$  was kept in the glassy state and  $S_{0.33}$  was placed at the beginning of the glass transition, whereas samples  $S_{0.55}$  and  $S_{0.75}$  underwent devitrification and were kept in the supercooled state. The inactivation rate ( $\text{Log}(N/N_0)$ ) at different times is shown in Fig. 3.

**Fig. 3** Long-term viability of hydrated yeast at intermediate  $a_w$  and 25 °C. Viability of samples  $S_{0.12}$  ( $a_w$ , 0.12; □),  $S_{0.33}$  ( $a_w$ , 0.33; ▤),  $S_{0.55}$  ( $a_w$ , 0.55; ▥), and  $S_{0.75}$  ( $a_w$ , 0.75; ▦) at different time points. Mean values of inactivation rate ( $\text{Log}(N/N_0)$ ) and standard deviations are presented. The letters associated with the conditions studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) as determined by the Tukey test



The viability of sample  $S_{0.12}$  was stable over time with 100% survival observed even after 1 year of storage. The viability of samples  $S_{0.33}$ ,  $S_{0.55}$ , and  $S_{0.75}$  was maximal (100% survival) for up to 3 months for  $S_{0.33}$  and  $S_{0.55}$  and 2 months for sample  $S_{0.75}$ , and then decreased slightly over time. In fact, the population of sample  $S_{0.33}$  had decreased by 0.14 log at the 6-month follow-up and by 1.24 at the 1-year follow-up. A loss of viability of 0.42 log CFU/g of product was observed after 6 months of storage for sample  $S_{0.55}$ . This value became equal to 2.36 log CFU/g of product after 1 year of storage for sample  $S_{0.55}$ . The viability of sample  $S_{0.75}$  decreased more rapidly, with a loss of 0.5 log CFU/g of product after 3 months and 2.4 log CFU/g of product after 6 months of storage.

The  $D$  values which correspond to the time needed to reduce a population by 90%, were determined from these data. The  $D$  values are presented in Table 1 and plotted against  $a_w$  in Fig. 4. As the viability of sample  $S_{0.12}$  did not decrease during the storage time used in our experiment, the  $D$  value was associated with long-term storage (symbolized by  $\text{Max}_{\text{survival}}$ ). Sample  $S_{0.33}$ , which was stored under conditions corresponding to the onset of the glass transition, had a  $D$

value equivalent to the more hydrated sample  $S_{0.55}$  (249 and 238 days respectively). The  $D$  value associated with sample  $S_{0.75}$  which was hydrated to an  $a_w$  of 0.75, was 37 days. As shown in Fig. 3, the  $D$  values did not decrease linearly with increasing  $a_w$ , with maximal value detected under the  $T_g$  (sample  $S_{0.12}$ ), a minimal value observed for the most hydrated condition (sample  $S_{0.75}$ ) and an intermediary plateau for an  $a_w$  located at the beginning of the glass transition or slightly above (samples  $S_{0.33}$  and  $S_{0.55}$ ). These results showed that the exposure of samples at or over the glass transition decreased the survival capacity of yeast compared with to the glassy state. However, the decrease was not abrupt and involved an intermediary phase that occurred in the glass transition and slightly above, where the  $D$  value corresponded to a few months.

**Short transient exposure of yeasts to states ranging from the glassy to the supercooled states via thermal means: ADY resistance to high temperature**

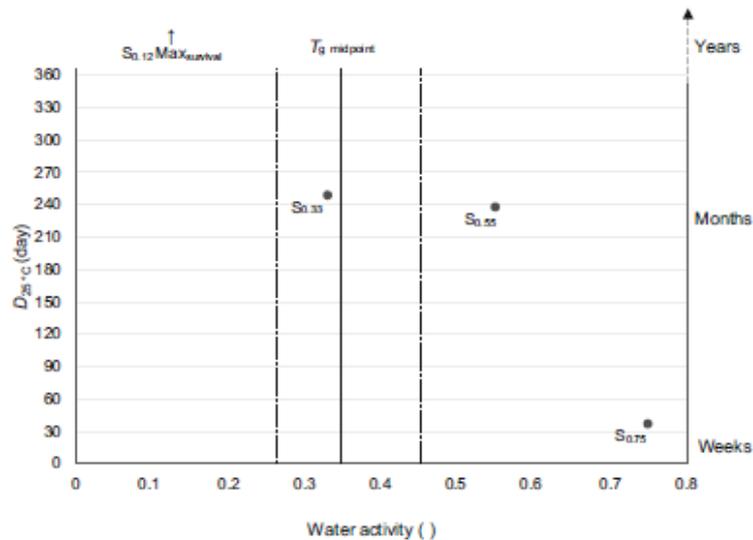
In this part of the study, ADYs were exposed to temporary heating over the  $T_g$ . The native sample  $S_{0.12}$  ( $a_w$ , 0.12) was in the glassy state at 25 °C.

Heat treatments at 50 and 75 °C for 10, 30, and 60 min were then applied. The heat treatment at 50 °C did not allow sample  $S_{0.12}$  to cross the phase transition curve, whereas at 75 °C, sample  $S_{0.12}$  overpassed the glass transition and was therefore in the supercooled state. The loss of viability observed after heat treatment is represented in Fig. 5. The heat treatments had no effect on the viability of samples, regardless of state, even for the longest treatment time of 60 min at 50 and 75 °C. Heat treatment at 100 °C was then applied to sample A for 10, 30, and 60 min. In such conditions, the sample was in

**Table 1**  $D$  values determined at 25 °C from data pertaining to the storage of samples  $S_{0.12}$  ( $a_w$ , 0.12),  $S_{0.33}$  ( $a_w$ , 0.33),  $S_{0.55}$  ( $a_w$ , 0.55), and  $S_{0.75}$  ( $a_w$ , 0.75)

Sample	$a_w$	$D_{25}$ °C (s)	$D_{25}$ °C (day)
$S_{0.12}$	0.12	$\text{Max}_{\text{survival}}$	$\text{Max}_{\text{survival}}$
$S_{0.33}$	0.33	$2.15 \cdot 10^7$	249
$S_{0.55}$	0.55	$2.07 \cdot 10^7$	238
$S_{0.75}$	0.75	$3.20 \cdot 10^6$	37

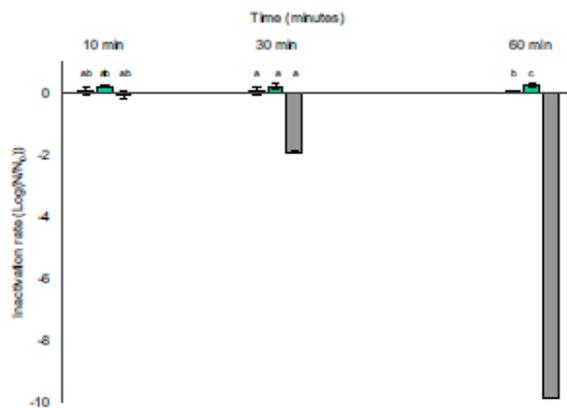
**Fig. 4** Effect of long storage in the supercooled state on the  $D$  value at 25 °C.  $D$  values are presented in function of the  $a_w$ . The time axis on the right corresponds to the time scales found during conservation at the different  $a_w$ . The value  $D$  point of sample at an  $a_w$  of 0.12 ( $S_{0.12}$ ) could not be represented because the viability of sample  $S_{0.12}$  did not decrease during the storage time used in our experiment; therefore, the “Max<sub>survival</sub>” was used. The arrow symbolizes that the  $D$  value could be several years. The two dashed curves represent the onset and the endset of the glass transition at 25 °C, and the solid line indicates the  $T_g$  midpoint of the glass transition of ADYs at 25 °C



the supercooled state. The results showed a thermal resistance in sample  $S_{0.12}$  of at least 10 min under the conditions tested. However, yeast viability decreased by 1.92 log CFU/g of product after 30 min of treatment. The entire population was killed after 60 min of this treatment.

#### Thermal resistance of yeasts hydrated at intermediate $a_w$ in the supercooled state

In this experiment, the impact of a change from the glassy state to the supercooled state (hydric devitrification) on the thermal resistance of ADY was studied.

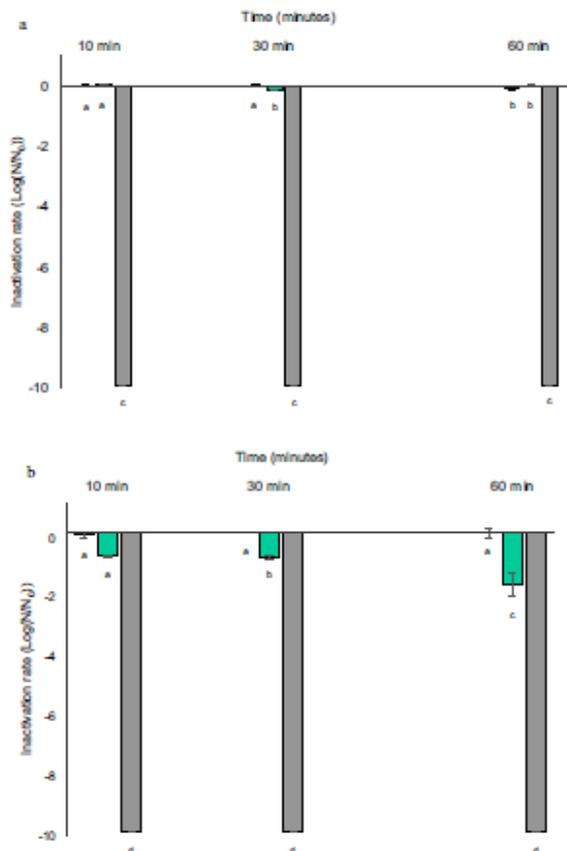


**Fig. 5** Effects of heat treatments on the viability of sample  $S_{0.12}$  ( $a_w$ , 0.12). Heat treatments at 50 °C (■), 75 °C (■) and 100 °C (■) were applied for 10, 30, or 60 min. Mean values of inactivation rate ( $\text{Log}(N/N_0)$ ) and standard deviations are presented. The letters associated with the conditions studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) as determined by the Tukey test

Sample  $S_{0.12}$  ( $a_w$ , 0.12) was rehydrated at intermediate  $a_w$  in order to obtain samples  $S_{0.33}$  ( $a_w$ , 0.33),  $S_{0.43}$  ( $a_w$ , 0.43), and  $S_{0.75}$  ( $a_w$ , 0.75). Sample  $S_{0.33}$  was in the beginning of the glass transition after the balancing step at 33% RH. Samples  $S_{0.43}$  and  $S_{0.75}$  entered in the supercooled state after the hydration step.

The effects of 10, 30 or 60 min of heat treatment at 50, 75, and 100 °C on the viability of yeasts are shown in Fig. 6. Heat treatment at 50 °C and 75 °C was not lethal to sample  $S_{0.33}$ , even after 60 min of treatment, whereas the 10-min heat treatment at 100 °C killed the entire population (Fig. 6a). Heat treatment at 50 °C of samples  $S_{0.43}$  and  $S_{0.75}$  had no effect on yeast viability, whereas heat treatment at 75 °C and 100 °C had an effect (Fig. 6b and c, respectively). Sample  $S_{0.43}$  lost 1.76 log CFU/g of product after 60 min of treatment at 75 °C, whereas sample  $S_{0.75}$  lost 3.1 log CFU/g of product after 10 min of treatment at the same temperature. No survival was detected at 100 °C for samples  $S_{0.43}$  and  $S_{0.75}$ .

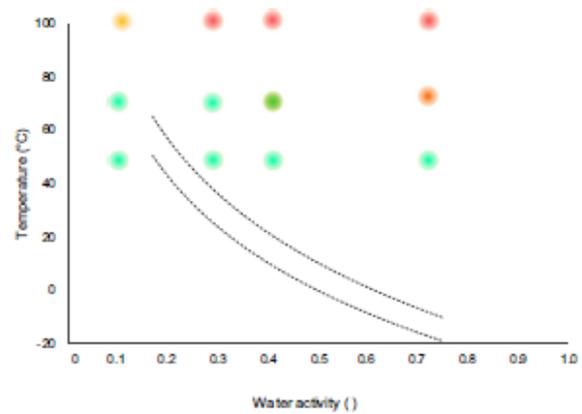
The  $D$  values, which were determined from the viability data of the heat-treated samples at  $a_w$  of 0.12 ( $S_{0.12}$ ), 0.33 ( $S_{0.33}$ ), 0.43 ( $S_{0.43}$ ), and 0.75 ( $S_{0.75}$ ), are presented in Table 2. At 50 °C, the  $D$  values were associated with maximum population survival (noted Max<sub>survival</sub>) for all samples, regardless of  $a_w$  and distance to the  $T_g$ . This value was calculated on the time scale of our experiment, where no decrease in viability was measured. Above 50 °C, the  $D$  value decreased with the increase in the distance to the glass transition curve. At 75 °C, the population of sample  $S_{0.43}$  which was hydrated at an  $a_w$  of 0.43, lost 90% of its population after 39 min of treatment. The  $D$  values were projected onto the ADY glass transition diagram (Fig. 7). The results showed that the thermal resistance was correlated with the hydration level and the exposure temperature.



**Fig. 6** Effects of heat treatments on ADY balanced at different RH values. Sample S<sub>0.12</sub> (a<sub>w</sub>, 0.12) was balanced at different RH values, to obtain samples S<sub>0.33</sub> (a<sub>w</sub>, 0.33), S<sub>0.43</sub> (a<sub>w</sub>, 0.43), and S<sub>0.75</sub> (a<sub>w</sub>, 0.75). Heat treatments at 50 °C (■), 75 °C (■) and 100 °C (■) were applied for 10, 30 or 60 min. Mean values of inactivation rate (Log(N/N<sub>0</sub>)) and standard deviations are presented. The letters associated with the conditions studied indicate significant differences (p < 0.05) as determined by the Tukey test. **a** Viability of sample S<sub>0.33</sub> (a<sub>w</sub>, 0.33) after heat treatments. **b** Viability of sample S<sub>0.43</sub> (a<sub>w</sub>, 0.43) after heat treatments. **c** Viability of sample S<sub>0.75</sub> (a<sub>w</sub>, 0.75) after heat treatments

**Discussion**

Our study showed that a<sub>w</sub> and temperature govern the physical state of ADY. Depending on the RH/temperature parameters of the environment, yeast can adopt a glassy state or a



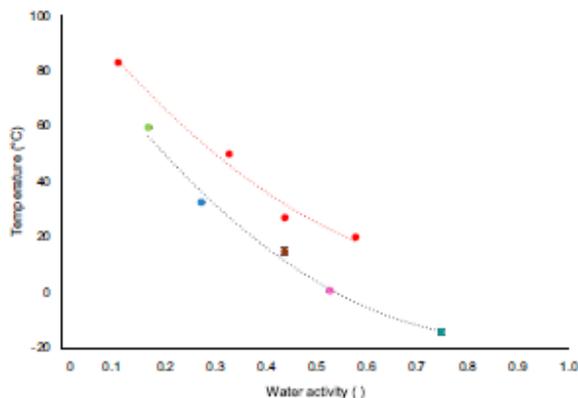
**Fig. 7** Effect of transient exposure in the supercooled state on D values at 50 °C, 75 °C, and 100 °C. D values are projected onto glass transition curves (dashed curves represent the onset and the end of the ADY glass transition). Max<sub>survival</sub> D time is indicated by ●; D between 2500 and 2000 s is indicated by ●; D between 1000 and 500 s is indicated by ●; D between 500 and 60 s is indicated by ●; D less than 60 s is indicated by ●

supercooled one. This phase transition could be explained by the rich trehalose content of yeast, which represents 23% of the weight of the dry matter of ADY. The representation of the T<sub>g</sub> curves of ADY (data from this study) and trehalose (curve reconstructed from Cardona et al. (1997) and Chen et al. (2000)) on the same a<sub>w</sub>/temperature diagram showed that they have the same shape (Fig. 8), although the T<sub>g</sub> curve for ADY is lower than that of trehalose. This shift could be explained by the contribution of yeast components, such as proteins, and intracellular crowding, which affect glass formation (Buitink and Leprince 2004). This shift indicates that the supercooled state exists in an extended range of a<sub>w</sub> values at the same temperature in yeast compared with trehalose.

Our study revealed that the transition from the glassy state to the supercooled state by wetting or heating decreased the survival capacity of yeast compared with glassy ADYs but, did not anneal it. Accordingly, survival for a few months was observed at intermediary RH value (between 33 and 75%) in tempered conditions (25 °C) (Fig. 3), whereas ADYs survived a few minutes at a very elevated temperature (Fig. 5). These results showed that the supercooled state was compatible with yeast survival at significant time scales whereas the internal

**Table 2** D values determined at 50 °C, 75 °C, and 100 °C from data pertaining to the viability of samples S<sub>0.12</sub> (a<sub>w</sub>, 0.12), S<sub>0.33</sub> (a<sub>w</sub>, 0.33), S<sub>0.43</sub> (a<sub>w</sub>, 0.43), and S<sub>0.75</sub> (a<sub>w</sub>, 0.75) after heat treatments

Sample	a <sub>w</sub>	Treatment at 50 °C		Treatment at 75 °C		Treatment at 100 °C	
		D <sub>50 °C</sub> (s)	D <sub>50 °C</sub> (min)	D <sub>75 °C</sub> (s)	D <sub>75 °C</sub> (min)	D <sub>100 °C</sub> (s)	D <sub>100 °C</sub> (min)
S <sub>0.12</sub>	0.12	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	894	14.9
S <sub>0.33</sub>	0.33	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	<60	<1
S <sub>0.43</sub>	0.43	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	2326	38.8	<60	<1
S <sub>0.75</sub>	0.75	Max <sub>survival</sub>	Max <sub>survival</sub>	392	6.5	<60	<1



**Fig. 8** Superposition of the glass transition curve of ADYs on the trehalose glass transition curve. The  $T_g$  midpoint mean values of the ADYs at different RH values were projected onto the phase transition diagram. The glass transition curve of trehalose represented by the dotted red curve was reconstructed based on the combination of data extracted from (Chen et al. 2000) and (Cardona et al. 1997)

state of yeast was not vitrified. In such conditions where the internal state of yeast was not vitrified, the survival was remarkable since contact with air during experiments could promote oxidative damages.

Few studies have investigated the stability of microorganisms at intermediary RH value, at which the cells exhibit no growth and no significant metabolic activity. In such intermediary hydric conditions (from 30 to 70%), their dominant structural state is the supercooled one when the temperature is above 25 °C. In most studies, intermediary RH values are considered as being highly lethal for microorganisms. For example, the study of freeze-dried *Lactobacillus salivarius* in skimmed milk showed the total destruction of the population (9 log destruction of cells) after 12 days of storage at 59% RH and ambient temperature (Castro et al. 1995). In another study, the survival of the pathogen *Listeria monocytogenes* was examined at various RH values and an intermediary RH (68%) was identified as the most lethal for cells (Zoz et al. 2016), with a loss of 3.2 log after 180 min of treatment. However, in these studies, no trehalose or any other sugar accumulated in the cytoplasm. In fact, *L. monocytogenes* was studied in PBS and the freeze-drying medium used for *L. salivarius* was composed of lactose, a reducing disaccharide, used as an extracellular lyoprotectant agent. The accumulation of disaccharide in *Escherichia coli*, a drying-sensitive bacterium, was increased its survival to different drying methods by 10,000-fold compared to a wild-type strain (Billi et al. 2000). Thus, the survival of ADYs at intermediary RH revealed by our study probably relies on the rich intracellular trehalose content of cells. With such trehalose content, the cell components are immersed in a highly viscous hydrated medium under a supercooled state that may explain the relative stability of cell components and the survival at intermediary RH.

In agreement with the published data (Lodato et al. 1999; Schebor et al. 2000), our results showed an increase in the thermal resistance of ADYs with desiccation and revealed that temporary exposure to heat treatment at 75 °C and 33% RH in the supercooled state was not lethal to cells, whereas this temperature was lethal to yeast in fully hydrated conditions (Fig. 6). Laroche et al. (2005) observed an optimal thermal resistance of *S. cerevisiae* at an  $a_w$  between 0.3 and 0.5 compared with high  $a_w$ , whereas a low thermal resistance was observed at an  $a_w$  of 0.1. Nevertheless, the heat treatment was performed at 150 °C on unsealed yeast samples. In such conditions, yeast powder may have been subjected to alteration, which was in contrast with the present study, where the maximal heating temperature of 100 °C was applied to sealed yeast samples. Moreover, Laroche and collaborators used yeasts cultivated in the laboratory, probably using a lower amount of trehalose. A decrease in the thermal resistance of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* bacteria in a lactose matrix was also observed upon wetting to intermediate humidity (Higl et al. 2007). It has been shown that a significant amount of trehalose protects cells against thermal disturbance (Hottiger et al. 1989; Van Dijk et al. 1995). The presence of a trehalose extracellular matrix (glassy or supercooled) afforded improved resistance of freeze-dried *S. cerevisiae* to a 100-min heat treatment at 70 °C, compared with other extracellular matrix compositions (Lodato et al. 1999). The fermentative activity of instant active dry yeast (with an accumulation of approximately 20% trehalose) decreased only by 0.8% in the supercooled state after heat treatment at 70 °C (Schebor et al. 2000). Therefore, the thermal resistance observed in the supercooled state is probably related to the presence of a high concentration of intracellular trehalose, which may increase the protection of macromolecules and cellular structures. Thermal disturbances induce mostly protein denaturation and aggregation (Lepock et al. 1993), as well as a loss of membrane integrity (Gershfeld and Murayama 1988; Bischof et al. 1995), leading to cell death. The thermal resistance of microorganisms depends on their level of hydration and the associated molecular mobility (Laroche et al. 2005). It has been shown that trehalose stabilizes proteins and membranes through the formation of hydrogen bonds (Crowe et al. 1984). Hence, the presence of trehalose molecules may reduce or even neutralize the effects of thermal perturbations. Furthermore, it has been shown that crowding caused by a high sugar concentration allows the preservation of protein folding under thermal treatment (Oshima and Kinoshita 2013; Shil et al. 2018).

In addition, the viscosity linked to the high concentration of trehalose allowed the stabilization of enzymes, such as plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase, by inhibiting protein unfolding (Sampedro and Uribe 2004). Viscosity is increased by the intermolecular interactions of sugar/sugar and sugar/water. However, the increase of the viscosity depends on the

structural characteristics of the sugar. For example, water molecules diffuse twice less quickly in a concentrated trehalose solution than they do in a sucrose solution (Conrad and De Pablo 1999; Ekdawi-Sever et al. 2003). This effect is linked to the ability of trehalose to interact with molecules other than sugars because of the absence of intramolecular hydrogen bonds. In the hydrated state, the high density of macromolecules and transient protein aggregation leads to the molecular crowding of the system, which is correlated with low diffusion (Nawrocki et al. 2017). It has been shown that the high crowding, caused by the accumulation of intrinsically disordered proteins, allows the stabilization of tardigrades (Hengherr et al. 2009; Boothby et al. 2017). Moreover, the dehydration of yeast cells leads to a volume decrease of about 50% (Dupont et al. 2010), which increases the intracellular confinement of molecules. Therefore, the stability of yeast in the supercooled state could be attributed to both the high concentration of trehalose, the internal viscosity and the association between molecular confinement and significant crowding.

This work was based on the study of the consequences of thermal and/or hydric devitrification, on the viability of yeasts via a short or long excursion into the supercooled zone. Our objective was to study the stability of ADYs near the limits of the glass transition. ADYs are products that are elaborated according to industrial know-how. This dehydrated matrix is a system that is ultra-concentrated in proteins and sugars (trehalose). After production in the dried form ( $a_w$ , 0.12), ADY can be subjected to hydric and thermal fluctuations. Moreover, in most geographical areas of the world, environmental conditions would place yeasts above the  $T_g$  in the supercooled state.

The results of this study revealed that the transition to the supercooled state is not lethal for yeasts. The trehalose that is present in the supercooled state would allow the persistence of viability at intermediate hydration levels, as well as thermal resistance in yeasts. The role of trehalose in the formation of the glassy state during dehydration is well described in the literature. However, our study highlighted the fact that trehalose may also have advantages regarding the stability of cells in the supercooled state by allowing the persistence of yeasts and in industrial applications where humidity and temperature are not stable. The supercooled state is compatible with storage of yeasts over a time scale of a few weeks to a few months. It can be reached after moderate dehydration at ambient temperature contrary to vitrification that requires drastic drying. This discovery could help to develop innovative preservation strategies with reduced energy costs and short time process. In future works, it would be interesting to study the contribution of both trehalose and different intracellular compounds to the formation of the supercooled state in a crowded context.

**Author contributions** PR, LB, and SD conceived and designed the research. PR carried out the experiments. All authors analyzed the data. PR and LB wrote the manuscript and PR, LB, and SD contributed to its critical revision. All authors read and approved the manuscript.

**Funding** This work was supported by grants from the “National Association of Technical Research (ANRT)”, Phileo by Lesaffre, Lesaffre group and the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)”.

**Data availability (data transparency)** All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

## Declarations

**Conflicts of interest/Competing interests** The authors declare no conflicts of interest and no competing interests.

**Ethics approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## References

- Aguilera JM, Karel M (1997) Preservation of biological materials under desiccation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37:287–309. <https://doi.org/10.1080/10408399709527776>
- Belton PS, Gil AM (1994) IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers* 34:957–961. <https://doi.org/10.1002/bip.360340713>
- Billi D, Wright DJ, Helm RF, Prickett T, Potts M, Crowe JH (2000) Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66:1680–1684. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1680-1684.2000>
- Bischof JC, Padanilam J, Holmes WH, Ezzell RM, Lee RC, Tompkins RG, Yamush ML, Toner M (1995) Dynamics of cell membrane permeability changes at supraphysiological temperatures. *Biophys J* 68:2608–2614. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80445-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80445-5)
- Boothby TC, Tapia H, Brozyna AH, Piszkiwicz S, Smith AE, Giovannini I, Rebecchi L, Pielak GJ, Koshland D, Goldstein B (2017) Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Mol Cell* 65:975–984.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>
- Buitink J, Leprince O (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48:215–228. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.02.011>
- Cardona S, Schebor C, Buera MP, Karel M, Chirife J (1997) Thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and trehalose crystallization. *J Food Sci* 62: 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04378.x>
- Carpenter JF, Crowe JH (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28: 3916–3922
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:172–176. <https://doi.org/10.1007/BF00164498>
- Chen T, Fowler A, Toner M (2000) Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology* 40:277–282. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2244>

- Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF (1982) Cellular responses to extreme water loss: The water-replacement hypothesis. *Cryobiology* 19:306–316. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(82\)90159-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(82)90159-6)
- Conrad PB, De Pablo JJ (1999) Computer simulation of the cryoprotectant disaccharide  $\alpha,\alpha$ -trehalose in aqueous solution. *J Phys Chem A* 103:4049–4055. <https://doi.org/10.1021/jp984102b>
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701–703. <https://doi.org/10.1126/science.223.4637.701>
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998a) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60:73–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>
- Crowe JH, Clegg JS, Crowe LM (1998b) Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. In: Reid DS (ed) *The properties of water in foods* ISOPOW 6. Chapman and Hall, New York, pp 440–455
- Dupont S, Beney L, Ferreira T, Gervais P (2010) Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1808:1520–1528. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2010.11.012>
- Dupont S, Rapoport A, Gervais P, Beney L (2014) Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8821–8834. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5>
- Ekdawi-Sever N, De Pablo JJ, Feick E, Von Meerwall E (2003) Diffusion of sucrose and  $\alpha,\alpha$ -trehalose in aqueous solutions. *J Phys Chem A* 107:936–943. <https://doi.org/10.1021/jp020187b>
- Eleutherio ECA, de Araujo PS, Panek AD (1992) Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 48:249–254. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02551.x>
- Gélinas P (2019) Active dry yeast lessons from patents and science. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:1227–1255. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12445>
- Gershfeld NL, Murayama M (1988) Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis. *J Membr Biol* 101:67–72. <https://doi.org/10.1007/BF01872821>
- Green JL, Angell CA (1989) Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J Phys Chem* 93:2880–2882. [https://doi.org/10.1022-3654/89/2093-2880\\$01.5000](https://doi.org/10.1022-3654/89/2093-2880$01.5000)
- Hengherr S, Worland MR, Reuner A, Brümmer F, Schill RO (2009) High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiol Biochem Zool* 82:749–755. <https://doi.org/10.1086/605954>
- Higl B, Ratjen J, Först P, Kulozik U, Kurtmann L, Carlsen CU, Skibsted LH, Risbo J (2007) Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnol Prog* 23:794–800. <https://doi.org/10.1021/bp070089d>
- Hottiger T, Boller T, Wiemken A (1989) Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? *FEBS Lett* 255:431–434. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81139-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81139-1)
- Laroche C, Fine F, Gervais P (2005) Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *Int J Food Microbiol* 97:307–315. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2004.04.023>
- Le Meste M, Champion D, Roudaut G, Blond G, Simatos D (2002) Glass transition and food technology: a critical appraisal. *J Food Sci* 67:2444–2458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08758.x>
- Lepock JR, Frey HE, Ritchie KP (1993) Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock. *J Cell Biol* 122:1267–1276. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.6.1267>
- Lerbret A, Affouard F, Bordat P, Hédoux A, Guinet Y, Descamps M (2011) Slowing down of water dynamics in disaccharide aqueous solutions. *J Non-Cryst Solids* 357:695–699. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.05.092>
- Leslie SB, Teter SA, Crowe LM, Crowe JH (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *BBA - Biomembr* 1192:7–13. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90136-8)
- Lodato P, Buera MP, Segovia de Huergo M (1999) Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:215–220. <https://doi.org/10.1007/s002530051511>
- Nawrocki G, Wang PH, Yu I, Sugita Y, Feig M (2017) Slow-down in diffusion in crowded protein solutions correlates with transient cluster formation. *J Phys Chem B* 121:11072–11084. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08785>
- Oshima H, Kinoshita M (2013) Effects of sugars on the thermal stability of a protein. *J Chem Phys* 138:245101. <https://doi.org/10.1063/1.4811287>
- Rapoport A, Golovina EA, Gervais P, Dupont S, Beney L (2019) Anhydrobiosis: inside yeast cells. *Biotechnol Adv* 37:51–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.003>
- Sampedro JG, Uribe S (2004) Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* 256–257:319–327. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009878.21929.eb>
- Schebor C, Galvagno M, Del Pilar BM, Chirife J (2000) Glass transition temperatures and fermentative activity of heat-treated commercial active dry yeasts. *Biotechnol Prog* 16:163–168. <https://doi.org/10.1021/bp990147y>
- Shil S, Das N, Sengupta B, Sen P (2018) Sucrose-induced stabilization of domain-II and overall human serum albumin against chemical and thermal denaturation. *ACS Omega* 3:16633–16642. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01832>
- Sun WQ, Irving TC, Leopold AC (1994) The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol Plant* 90:621–628. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02516.x>
- Tapia H, Young L, Fox D, Bertozzi CR, Koshland D (2015) Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:6122–6127. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506415112>
- Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mujawar MM, Pasha SS (2015) Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. Elsevier B.V.
- Van Dijk P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM (1995) Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* 61:109–115. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.109-115.1995>
- Wright JC (2001) Cryptobiosis 300 years on from van Leeuwenhoek: what have we learned about tardigrades? *Zool Anz* 240:563–582. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00068>
- 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* 11:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148418>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Sporicidal efficiency of an ultra-high irradiance (UHI) near UV/visible light treatment: An example of application to infected mandarins

Thibaut Thery, Laurent Beney, Cédric Grangeteau, Sébastien Dupont\*

Univ. Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro Dijon, PAM UMR A 02.102, 21000, Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

UHI  
Blue light  
Spores  
*Bacillus cereus*  
*Penicillium digitatum*  
Citrus fruits

### ABSTRACT

The resilience of bacterial and fungal spores to common decontamination methods is a major concern in several fields including food industry. In contaminated products, those latent forms can lead to a delayed microbial development with potential hazardous health effects. This study investigates the efficiency of an ultra-high irradiance (UHI) LED device to induce inactivation of spores *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Penicillium* spp. Suspensions of bacterial and fungal vegetative cells and spores were exposed to UHI 385 and 405 nm light for periods up to 30 min. The 385-nm wavelength showed a higher potential than 405 nm with a reduction of *S. cerevisiae* spores of 4.2- and 0.8-  $\log_{10}$  CFU/ml after 30 min, respectively. Similar results were observed on *B. cereus* endospores with a 4.2  $\log_{10}$  CFU/ml reduction after 30 min at 385 nm. As expected, due to the documented resistance of spores, the doses required inactivating vegetative cells of *B. cereus* and *S. cerevisiae* were significantly lower with a 4.5- $\log_{10}$  CFU/ml reduction achieved after 2 and 15 min at 385 nm, respectively. After a 15-min treatment, spore population of the filamentous fungi *P. digitatum* and *P. expansum* were reduced by 4 and 1.5  $\log_{10}$  CFU/ml, respectively. The application potential of UHI 385-nm has been assessed in a challenge test on infected mandarins. After 6 days, a reduction of mycelial and sporulation areas of 72% and 85%, respectively, has been observed on treated fruits. Great promises go along with UHI 405 and 385 nm light treatment for applications in fields where microbial resistance is a hurdle.

### 1. Introduction

In response to the depletion of nutrients in their environment, some genera of bacteria and fungi have developed specialized cells called spores (Pacheco et al., 2022; Tehri et al., 2018). Spores represent dormant forms of microorganisms with a slowed down metabolism and are characterized by structural changes such as the development of external membranes, modification of cell wall composition, and genetic modifications (Cho & Chung, 2020; Rozali et al., 2017). The concern with bacterial and fungal spores in food industry has been highlighted by several outbreaks such as infections due to *Bacillus cereus* spores (Saleh-Lakha et al., 2017) or *Penicillium* on foods (Probst et al., 2007). Concerning fungi, food contamination involves also yeasts such as *Saccharomyces* species (Suiker et al., 2021). Contamination via resilient spores can occur on contaminated surfaces or the handling of raw material (Chaves et al., 2017). The specific structure of spores and their mechanism of repair confers them extreme resistance to chemical and biological disinfectants and are thus excellent vehicles of microbial propagation (Dijksterhuis, 2019). Physical methods such as heat

treatment or UV radiation have shown some limitations to inactivate bacterial endospores (Cortés et al., 2019). Fungal spores, including yeast spores, have also proved to be more resistant than vegetative forms to different factors of stress such as acid stress or heat treatment (Coluccio et al., 2008; Rachon et al., 2021).

Despite a low penetration factor in liquid systems, UV light irradiation has demonstrated some sporicidal effect and its potential in water and surfaces disinfection (Collivignarelli et al., 2021). Although its application has been suggested to be extended to various foods, such treatments face several drawbacks: consumers' mistrust towards processes inducing modification of genome or not environmentally friendly; the unsuitability of treatments to fresh products, leading to a potential modification of organoleptic properties (Lv et al., 2021). Several studies have shown that light treatment is efficient to destroy endospores with the use of exogenous photosensitizer, which is, however, a hurdle to applications in food industry (Lee et al., 2020). Antimicrobial blue light (ABL) treatment is derived from antimicrobial photodynamic therapy (PDT), which is traditionally used to treat local bacterial and fungal infections (Sousa et al., 2019). In comparison to PDT, blue light

\* Corresponding author.

E-mail address: [sebastien.dupont@u-bourgogne.fr](mailto:sebastien.dupont@u-bourgogne.fr) (S. Dupont).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109568>

Received 27 July 2022; Received in revised form 12 December 2022; Accepted 15 December 2022

Available online 18 December 2022

0956-7135/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

inactivates bacteria without the involvement of exogenous photosensitizer (Rapacka-Zdonczyk et al., 2019). At 405 nm, blue light inactivation is associated with the photoexcitation of endogenous photosensitizers, mostly porphyrins, and the subsequent generation of cytotoxic ROS such as singlet oxygen, which induce damages to surrounding biomolecules and genetic material (Yoshino & Yoshida, 2018). The presence of coporphyrin with Soret bands in the 400–420 nm regions of the visible spectrum has been reported in several bacteria, including *Bacillus* species and fungi (Plavski et al., 2018). As suggested by Denis et al. (2013), the mechanisms of blue light spore and vegetative cells inactivation are probably fairly similar. Moreover, the presence of an absorption peak of 408–420 nm in *Bacillus thuringiensis* spores correlates with the Soret band. Both mechanisms are thought to be oxygen-dependent.

In food industry, the destruction of spores is generally achieved with a sterilization process which consists in the use of an ultra-high temperature treatment for a short period of time. In addition to a potential resistance of spores to inappropriate sterilizations, this process is not suitable for any food product. An increasing interest has aroused in the use of aBL to preserve food products (Ghate et al., 2019). Blue light has already been shown to prevent germination of spores of fungal contaminants of fruits (Lafuente et al., 2018). However, most studies published so far use low power-treatments for long periods of time. A study by Maclean et al. (2013) has shown the sporicidal effect of a high-irradiance (40 mW cm<sup>-2</sup>) 405-nm light treatment on *B. cereus* endospores, without the use of exogenous PS. This treatment reduced endospore colony-forming units by up to 4-log<sub>10</sub> with an overall energy of 1.73 kJ cm<sup>-2</sup>. In a similar way to sterilization, we developed in our laboratory an ultra-high irradiance (UHI) LED-based device (Lang et al., 2022) which is able to distribute blue-light at 250 mW cm<sup>-2</sup> on samples.

Supplementary advantages of the LED technology include the specificity of the wavelength used and the high irradiance it can reach in a cost-effective way. This device has been shown to inactivate vegetative forms with an emitting light at 405 nm of yeasts *S. cerevisiae* after short treatments (less than 10 min) (Lang et al., 2022), a time of treatment that is similar to the time of exogenous PS-based treatments previously reported (Ghate et al., 2019). In the blue light wavelength range, other wavelengths than 405 nm can also exhibit a lethal effect on microorganisms. Several reports show that wavelength around 385–390 nm showed a greater efficacy in correlation with a higher proportion of DNA damages in eukaryotic cells (Almeida et al., 2015; Lawrence et al., 2018).

In the present work, we investigated the efficacy of UHI blue light treatment (385 nm and 405 nm) against vegetative forms and resistant counterparts (spores) of *B. cereus*, *S. cerevisiae* as well as the molds *P. digitatum* and *P. expansum*. Fresh citrus fruits are excessively treated to avoid contamination by fungi and limit the economic loss. Fresh fruits can suffer damages during several stages before distribution and be easily infected. *P. digitatum* is a known contaminant of fresh citrus fruits, including mandarins (Khan et al., 2021). The UHI blue light treatments were applied in a challenge test against spores of this microorganism on organic mandarins to evaluate the possibility of using this process on fresh fruits.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical and reagents

All reagents and media were supplied by Sigma- Aldrich. Luria-Bertani (LB) agar, Yeast Extract Potato Dextrose (YEPD) agar and Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma Aldrich; Merck KGaA) were used for the growth of *B. cereus*, *S. cerevisiae* and *Penicillium* spp., respectively.

All chemicals had a chemical grade >97%. Modified G medium consisted in 0.2% yeast extract, CaCl<sub>2</sub> (0.17 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.87 mM); MgSO<sub>4</sub> (0.81 mM), MnSO<sub>4</sub> (0.24 mM) ZnCl<sub>2</sub> (17 μM), CuSO<sub>4</sub> (20 μM), FeCl<sub>3</sub> (1.8 μM), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15.5 mM), as described previously by Hornstra et al. (2006).

### 2.2. Microorganisms

The Gram-positive bacteria *B. cereus* ATCC 14579 was supplied by ATCC (Virginia, USA), the diploid yeast *S. cerevisiae* BY4743 by Euroscarf (Frankfurt, Germany) and the filamentous fungus *P. digitatum* DSM 2739 was provided by DSMZ culture collection (Leibniz Institute, Germany). *P. expansum* was a gift from the laboratory of Prof. Elke Arendt at University College Cork (Ireland).

### 2.3. Blue light UHI device

The LED array-based prototype (NLX, Next Lighting eXperience, La Chapelle-Vendômoise, France) used in the study has been described previously by Lang et al. (2022). It was used at a maximal irradiance (P<sub>max</sub> = 250 mW.cm<sup>-2</sup>) at two visible wavelengths (385 nm or 405 nm) for 0–30 min. These two wavelengths are considered as the most effective chosen due to their efficiency to inactivate microorganisms at low irradiance (Hessling et al., 2017). Irradiance (mW.cm<sup>-2</sup>) was measured with a PG200N spectrometer (UPRTEK Europe ® | DL Technology GmbH, Germany).

### 2.4. Infection of wounded fruits

Organic mandarins were purchased from local store. Fruit surface was disinfected in 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min followed by two washing steps in sterile distilled water for 10 min and left for drying under lamina flow for 20 min. A 2-mm deep x 4-mm diameter incision was made with a scalpel between the pedicel and the side of the fruit as described previously (Yamaga et al., 2015). A 10 μL of *P. digitatum* spore suspension (10<sup>7</sup> conidia/mL) was then inoculated into the wound. Controls consisted in wounded fruits inoculated with water only.

### 2.5. Spore preparation

Stock solutions of *B. cereus*, *S. cerevisiae* and *P. digitatum* and *P. expansum* were streaked upon LB agar, YPD agar and PDA, respectively and incubated at 30 °C. *B. cereus* and *S. cerevisiae* were cultured for 24 h and 48 h, respectively. Growth of fungal mycelium was monitored over 7 days in dark and in sealed Petri dish.

A preculture of *B. cereus* consisted in the resuspension of a single colony in LB broth in the same conditions as described above, under continuous shaking. Following preculture, an aliquot was resuspended in fresh LB broth for a culture phase, starting at an Optical Density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.05. The strain was cultured until the stationary phase was reached after an 18 h-incubation period and used at a concentration of 1 × 10<sup>7</sup> CFU/mL.

One milliliter of the culture solution of *B. cereus* was cultured for 4 days at 30 °C in The medium was buffered at pH = 7.2. After 48 h of incubation, spores and vegetative cells were centrifuged (7000 g/10 min), washed twice in PBS followed by a final washing in cold sterile distilled water, and kept overnight at 4 °C. Washing with cold water and storage at 4 °C were repeated for 2 days. A heat treatment (70 °C/10 min) was applied to inactivate remaining vegetative cells. Following a final washing with cold water, spores (10<sup>7</sup> spores/mL) were stored at 4 °C until their use in light treatment. A Schaeffer and Fulton staining (Schaeffer & Fulton, 1933) was performed in order to determine the spore concentration.

Fresh colonies of *S. cerevisiae* BY4743 were harvested from YPD agar and sub-cultured in fresh YPD broth for 48 h. Following incubation, cells were either cultured for 24 h in fresh YPD (solution of vegetative cells, working concentration 1 × 10<sup>7</sup> CFU/mL) or washed twice in PBS and transferred to 1% (w/v) potassium acetate (KAc) (OD<sub>600</sub> = 0.05) and cultured for 7 days at 25 °C under agitation to produce spores (Gerke et al., 2006). Cells were then washed in cold distilled water, heat treated (80 °C/10 min) to inactivate remaining vegetative cells. Spores in forms of tetrad were observed under microscope (Zeiss Primo Star,

magnification  $\times 400$ ) ( $>95\%$  of whole population) and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in sterile distilled water (SDW) at a concentration of  $10^7$  spores/mL.

After a 7-day incubation period, *P. digitatum* and *P. expansum* mycelium was washed with cold distilled water and filtered through  $40\text{ }\mu\text{m}$  cell strainer (Nunc), in order to collect fungal spores. Spores were stored in distilled water at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a concentration of  $10^6$  spores/mL until further use.

### 2.6. Blue light treatment of spore solutions

Microbial solution ( $2\text{ mL}$ ,  $10^6$  or  $10^7$  spores/mL, as specified above) was poured into the wells of a 12-well dish (Nunc) and submitted to UHI treatment at a distance of  $20\text{ cm}$  below the LED system as described previously (Lang et al., 2022). Briefly, The LED array was positioned directly above the central sample wells of the plate and cooling fans were used to dissipate heat. Temperature was controlled with fans during the whole treatment to be maintained below  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Following treatment, microbial solution was serially diluted and microbial loads (in  $10\text{ }\mu\text{L}$  drops) of *B. cereus*, *S. cerevisiae*, *P. digitatum* and *P. expansum* were determined after 24 h, 48 h and 72 h of incubation, respectively at temperatures indicated above. Development of mycelium was also monitored with microscopy observations (Zeiss Primo Star, magnification  $\times 400$ ). Concentration was corrected by measuring the remaining volume of liquid due to evaporation during treatment. Control (in dark) consisted in Petri dish covered with aluminum foil and submitted to a 30-min treatment.

### 2.7. Treatment of infected fruits

The efficacy of a blue light treatment to limit the development of fungus in a challenge test was performed on wounded fruits and monitored as described previously (Yamaga et al., 2015). Two treatment parameters with no apparent damages on the fruits, determined beforehand, were assessed: illumination at  $385\text{ nm}$  at  $250\text{ mW cm}^{-2}$  for  $10\text{ min}$  or  $125\text{ mW cm}^{-2}$  for  $20\text{ min}$  and incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the dark. The distance between samples and LED was maintained at  $20\text{ cm}$  during all experiments. The surface temperature of the fruits was monitored after treatment with a thermal imaging camera (Xintai Instrument, China) in order to avoid heat-induced damage on the spores. The diameters of the sporulation area, mycelial area and sporulation area, as described by

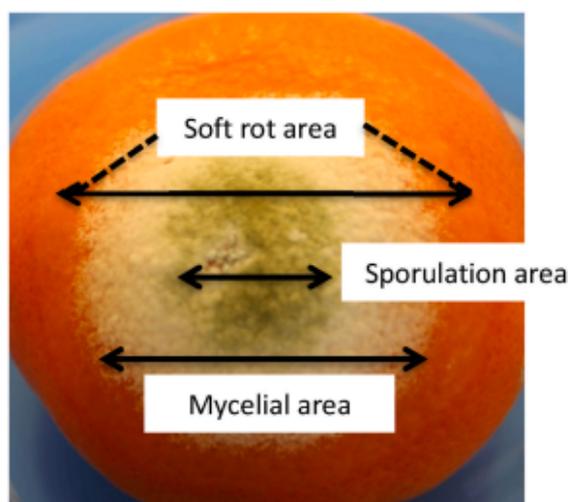


Fig. 1. Representation of the different areas of fungal development on infected mandarins.

Yamaga et al. (2015), were measured at day 3 and day 6 after treatment (Fig. 1). Three fruits were used for each treatment.

### 2.8. Statistical analysis

All data presented in the figures are expressed as the mean  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed via Tukey's range test to discriminate between means with XLSTAT  $\text{\textcircled{R}}$  for Excel  $\text{\textcircled{R}}$  statistical software (Addinsoft  $\text{\textcircled{R}}$ , Paris, v. 2016).

## 3. Results

### 3.1. Antimicrobial activity of UHI blue light against vegetative forms of *B. cereus* and *S. cerevisiae*

Efficiency of UHI treatments was firstly assessed on vegetative cells suspended in liquid medium. Solutions of vegetative cells of *B. cereus* and *S. cerevisiae* were irradiated with an ultra-high irradiance ( $250\text{ mW cm}^{-2}$ ) blue light ( $385$  and  $405\text{ nm}$ ) up to  $15\text{ min}$  and the viability was determined after plating on growth medium. Inactivation rates of  $1.8\text{ log}$  and over  $4.5\text{ log}$  (limit of detection) were observed on *S. cerevisiae* after  $15\text{ min}$  of treatment at  $405\text{ nm}$  and  $385\text{ nm}$ , respectively (Fig. 2). *B. cereus* showed a higher sensitivity than *S. cerevisiae*, with an inhibition below the limit of detection within  $5\text{ min}$  for the two wavelengths. For both species, a treatment with the  $385\text{ nm}$  wavelength appeared more efficient to inactivate growth than with  $405\text{ nm}$ .

### 3.2. Antimicrobial activity of high irradiance blue light against spores

The efficiency of UHI treatments was tested on bacterial and fungal spores suspended in liquid medium. At  $405\text{ nm}$ , after a  $15\text{-min}$  treatment, a reduction of  $0.4$  and  $0.2\text{ log}_{10}\text{ CFU/ml}$  was observed in population of *B. cereus* and *S. cerevisiae* spores, respectively (Fig. 3). A  $30\text{-min}$  treatment lead to a  $1.2\text{ log}$  inactivation of *B. cereus* spores for an overall energy of  $450\text{ J.cm}^{-2}$ . A similar treatment induced a  $0.8\text{-log}$  inactivation of *S. cerevisiae* spores. The treatment with the  $385\text{ nm}$ -wavelength was more efficient against both species, with a reduction of  $4.3$  and  $4.2\text{ log}_{10}\text{ CFU/ml}$  of spores of *S. cerevisiae* and *B. cereus*, respectively, after  $30\text{ min}$ .

Spores of filamentous fungi were also submitted to a UHI light treatment (Fig. 4). After a  $15\text{-min}$  treatment, inactivation rates of  $3.9$  and  $4.1\text{ log}_{10}\text{ CFU/ml}$  at  $405$  and  $385\text{ nm}$ , respectively were observed for spores of *P. digitatum*. Spores of *P. expansum* were also affected by the blue light treatment to a lesser extent since a reduction of only  $1.3$  and  $1.8\text{ log}_{10}\text{ CFU/ml}$  was achieved after a  $15\text{-min}$ -treatment at  $405$  and  $385\text{ nm}$ . *Penicillium* spores were less resistant than yeasts and bacteria counterparts, regardless of the wavelength (Fig. 4). As observed for *B. cereus* and *S. cerevisiae*, the wavelength  $385\text{ nm}$  was more effective than  $405\text{ nm}$  to inactivate the fungal spores. However, this difference of efficiency was less pronounced for the filamentous fungi.

The ability of viable conidia of *P. digitatum* to germinate in fresh medium following the treatments was monitored under microscope (Fig. 5). The number of living/germinating conidia, and subsequently the amount of mycelium, was strongly reduced by the light treatment at the two wavelengths. Moreover, the length of mycelium produced by the living conidia after  $72\text{ h}$  of growth in fresh medium was strongly reduced as the treatment progressed, which suggests a delayed germination (comparison of Fig. 5C and D, or Fig. 5F and G) in addition to the lethal effect of the treatment.

### 3.3. Effect of blue LED irradiation on fruit decay and mycelial growth

Efficiency of UHI treatments on the limitation of blue mold symptom development was assessed by treating mandarin fruits contaminated by *P. digitatum*. Fruits were treated with UHI  $385\text{ nm}$  light with irradiances between  $125\text{ mW.cm}^{-2}$  and  $250\text{ mW.cm}^{-2}$ . These parameters have been chosen to maintain the fruit integrity, without apparent damages after

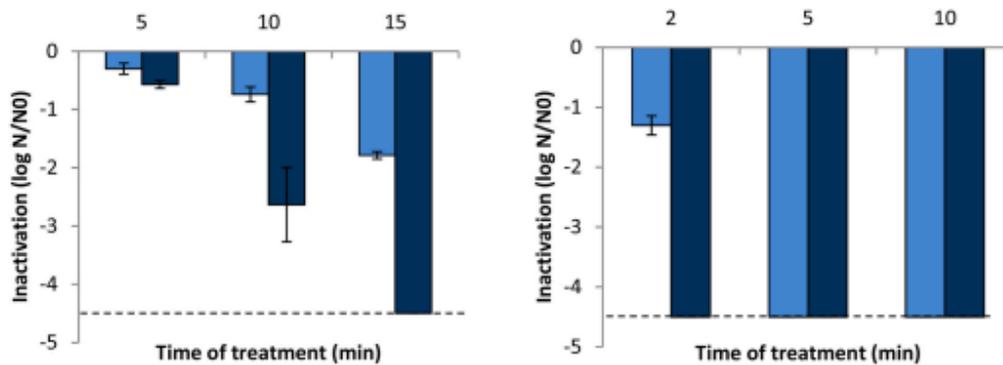


Fig. 2. Inactivation of *S. cerevisiae* (left) and *B. cereus* (right) following UHI treatment ( $250 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) at 385 nm (dark blue) and 405 nm (light blue). Inactivation was determined as the ability to grow on nutrient-rich media compared to an untreated microbial solution. Dashed line indicates the limit of detection set at  $-4.5 \log$ .

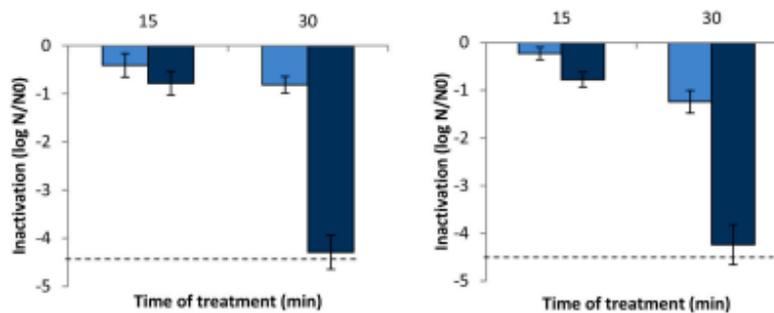


Fig. 3. Inactivation of spores of *S. cerevisiae* (left) and *B. cereus* (right) following UHI treatment ( $250 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) at 385 nm (dark blue) and 405 nm (light blue). Inactivation was determined as the ability to grow on nutrient-rich media compared to an untreated spore solution. Dashed line indicates the limit of detection set at  $-4.5 \log$ .

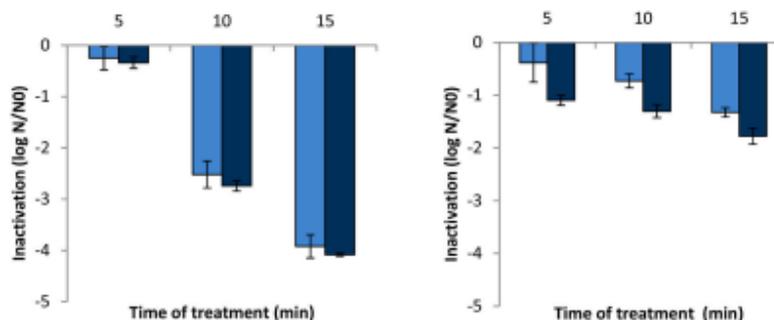


Fig. 4. Inactivation of spores of *P. digitatum* (left) and *P. expansum* (right) following UHI treatment ( $250 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) at 385 nm (dark blue) and 405 nm (light blue). Inactivation was determined as the ability to grow on nutrient-rich media compared to an untreated spore solution.

treatment. Fungal growth was observed over a 6-day period after inoculation and blue LED irradiation (Fig. 6). The diameters of three fungal areas (soft rot, mycelium and sporulation) were significantly ( $t < 0.05$ ) reduced after a blue light treatment at 385 nm (Fig. 6A). However, after 3 days, no significant differences were observed between the two treatments. Compared to the dark treatment (control), the reduction of the sporulation area at day 6 with the treatment at  $125 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  and  $250 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  were 55% and 85%, respectively (Fig. 6B). At a similar energy dose, a shorter treatment (10 min) was significantly more efficient to reduce the area of sporulation and soft rot after 6 days of incubation. After the treatment at a lower irradiance ( $125 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), the

incidence of fungal growth on each area increased between day 3 and 6. For the sporulation area, the incidence increased from 27% at day 3–45% at day 6 (Fig. 6B).

#### 4. Discussion

In this study, a UHI-LED blue light treatment ( $250 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) induced up to  $4.5 \log_{10}$  CFU/ml inactivation in vegetative cells and spores of bacteria and fungi within a 30-min treatment. The activity of blue light (especially  $\sim 405 \text{ nm}$ ) has gained a great interest and has been extensively reported against various microorganisms, including *S.*

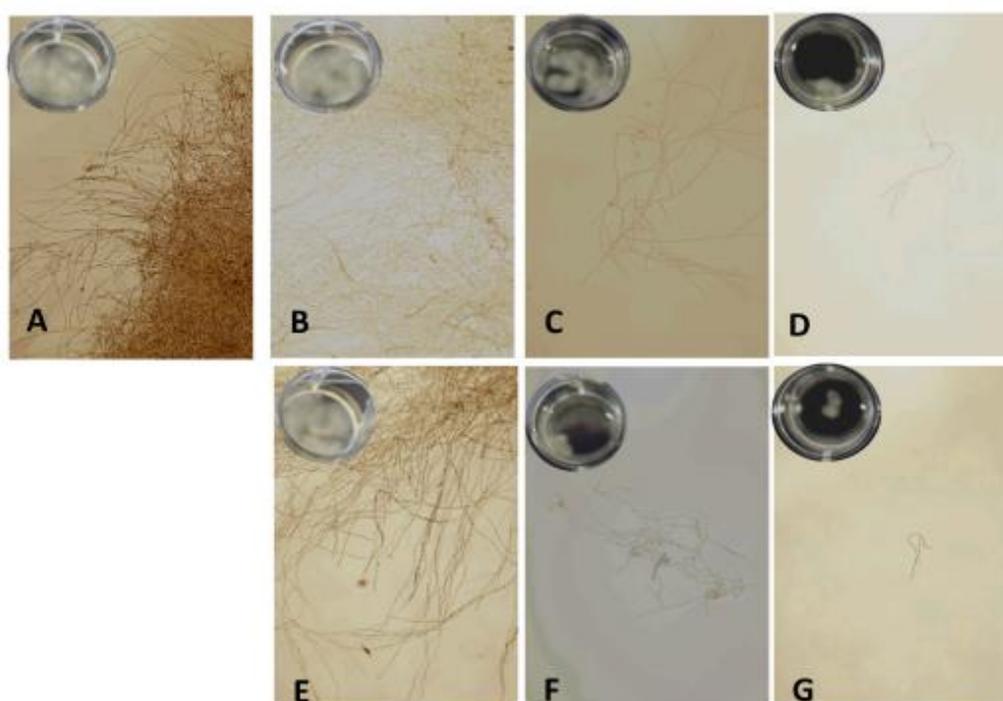


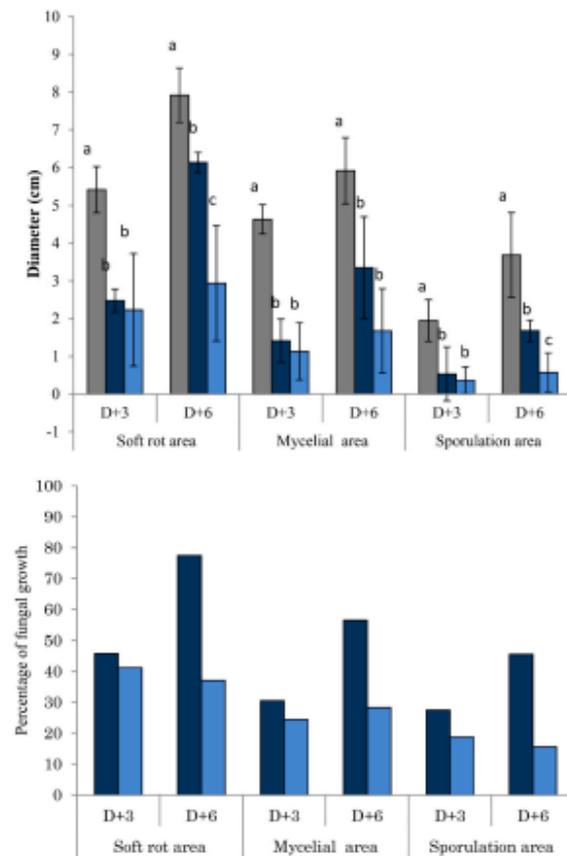
Fig. 5. Observation of germination ability of *P. digitatum* spores in growth medium. Up: under microscope 24 h after treatment: control (A); 405 nm-treatment for 5 (B), 10 (C) and 15 min (D); 385 nm-treatment for 5 (E), 10 (F) and 15 min (G); insert top left corner: in fresh medium after 72 h of incubation in 12-well dish.

*cerevisiae* or *B. cereus* (Hessling et al., 2017; Hoenes et al., 2018). With an irradiance level of  $40 \text{ mW cm}^{-2}$  for 2 h, Murdoch et al. (2013) have reported a 5-log inhibition of *S. cerevisiae* cells; which corresponds to an energy dose/reduction log of  $58 \text{ J cm}^{-2} \log^{-1}$ . With the UHI device of the present study, an energy dose of  $58 \text{ J cm}^{-2}$  was achieved in  $\sim 4$  min only leading to an inactivation  $0.3 \log_{10}$  CFU/ml (Fig. 2). However, the longer the treatment is applied, the shorter the energy dose/reduction log gets. After 15 min, the energy dose/reduction log was  $125 \text{ J cm}^{-2} \log^{-1}$ . The difference of efficiency may highlight different mechanisms of inactivation between short and long light-based treatments. The higher dose required to inactivate *S. cerevisiae* in our study could also be explained by the difference of initial cell concentration. A different turbidity and potential aggregates of cells in the suspension may reduce light penetration and less exposure to the microorganisms (Kumar et al., 2015). A population of *B. cereus* irradiated at  $21 \text{ mW cm}^{-2}$  with a 405-nm light LED for 4 h was reduced by  $2.3 \log$  ( $306 \text{ J cm}^{-2}$ ) (Kumar et al., 2015). The corresponding average dose/log-level of  $158.6 \text{ J cm}^{-2} \log^{-1}$  is much higher than the energy dose of  $30 \text{ J cm}^{-2} \log^{-1}$  (Fig. 1). However, several specific features of the experimentations, such as the distance between LED and sample or the difference of treatment time, could explain the differences in energy dose. Moreover, in a previous study, we have shown that, for the same energy, stronger irradiances can induce higher inactivation levels (Lang et al., 2022).

The UHI LED treatments applied in our study induced inactivation rates of several log in both bacterial and fungal spore population. As reported before for *B. cereus* and *C. difficile* and for other inactivation processes, the amount of light energy to kill endospores is generally much higher than the energy needed to kill vegetative form (Cho & Chung, 2020; Hessling et al., 2017; Maclean et al., 2014). At 405 nm, *B. cereus* spore population was reduced at an energy dose/log reduction of  $360 \text{ J cm}^{-2} \log^{-1}$ . In a previous study, *B. cereus* spores have been reduced after a 12 h blue-light treatment at  $40 \text{ mW cm}^{-2}$  at an energy

dose/log reduction of  $480.6 \text{ J cm}^{-2} \log^{-1}$  (MacLean et al., 2013). To the best of our knowledge, despite many studies on vegetative forms (Cieplik et al., 2014; Murdoch et al., 2013), the use of aBL against *S. cerevisiae* spores has not been reported. The higher resistance of yeast spores in comparison to vegetative yeasts (Figs. 2 and 3) observed in our study shows that spore is a resistant form against blue light, as reported against other physical treatments (Rachon et al., 2021). Concerning spores of filamentous fungi an energy dose of  $150 \text{ J cm}^{-2}$  was achieved within 10 min on spores of *P. digitatum* (Fig. 4). A similar inactivation has been obtained on *A. niger* conidia using a much lower irradiation ( $63 \text{ mW cm}^{-2}$ ) but requires long time treatments leading to a higher energy dose ( $1.3 \text{ kJ cm}^{-2}$ ) (Murdoch et al., 2013).

*B. cereus* spores showed less sensitivity to blue light treatments than the spores of *Penicillium*. Differences of sensitivity between *Penicillium* species to a blue light treatment have been observed previously (Lafuente & Alferez, 2015). Bacterial spores are generally observed as more resistant than fungal spores to many sporicidal treatments (Eissa et al., 2014). Yet, when submitted to a UV treatment, the inactivation levels between *B. thuringiensis* and *Aspergillus fumigatus* are comparable (Nakpan et al., 2019). This is explained by the fact that UV irradiation (especially UV-C) can directly damage DNA inside the core of the spore and inhibit the cell germination (Taylor et al., 2020). Among the numerous endogenous photosensitizers identified in vegetative cells, intracellular porphyrins, excited around 405 nm, are the main targets of blue light (Bohm et al., 2020). However, the presence of porphyrins inside the spore forms of fungi or bacteria seems unclear, emphasized by the poor efficiency of blue light treatment without the use of exogenous porphyrins. Compared to vegetative forms, a possible lower content in porphyrins and in heme proteins could be involved in the higher resilience of spores to blue light inactivation (Liu et al., 2004). In *B. subtilis* spores, DNA appears to be the main target of blue light inactivation since resistance was only attributed to DNA repair mechanisms, such as SASP



**Fig. 6.** Effect of 385 nm treatment on fungal areas caused by *P. digitatum* on mandarins. A) Diameter of the different fungal areas on mandarins: grey: control; dark blue: 125 mW cm<sup>-2</sup> for 20 min; light blue: 250 mW cm<sup>-2</sup> for 10 min; B) Incidence (%) of fungal growth compared to untreated fruits. dark blue: 125 mW cm<sup>-2</sup> for 20 min; light blue: 250 mW cm<sup>-2</sup> for 10 min. The different letters indicate significant differences between control (dark) samples and illuminated samples (Tukey's multiple range test,  $p < 0.05$ ).

or DNA repair protein (Djouali et al., 2018). Contrary to commonly used low-power treatments, we hypothesized that the use of high power visible light may lead to the destruction by oxidative burst of cell walls and cytoplasmic membranes (Grangeteau et al., 2018).

Compared to 405 nm, higher inactivation rates have been observed at 385 nm, regardless of the microbial genus, and physiological state (vegetative cells or spores). The antimicrobial potential of the wavelength 385 nm has not been extensively studied. However, the existing data indicate that wavelengths around 385 nm are usually more efficient than 405 nm to inactivate Gram-positive and Gram-negative bacteria, as shown against *E. coli* vegetative cells (Malik et al., 2017). The proximity of wavelength 385 to UV-A and a higher generation of ROS could be involved in this higher activity. For example, while this mechanism has been largely attributed to UV-B, Lawrence et al. (2018) have shown that cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) can be generated in skin cells after light treatment at 385 and 405 nm, with a higher proportion after the 385-nm treatment. A fortiori, the treatment used here may lead to the degradation of nucleic acids (Almeida et al., 2015; Lawrence et al., 2022). Further investigation will be necessary to determine the part of this degradation with the UHI device.

Compared to 405 nm, higher inactivation rates have been observed

at 385 nm, regardless of the microbial genus, and physiological state (vegetative cells or spores). The antimicrobial potential of the wavelength 385 nm has not been extensively studied. However, the existing data indicate that wavelengths around 385 nm are usually more efficient than 405 nm to inactivate Gram-positive and Gram-negative bacteria, as shown against *E. coli* vegetative cells (Lui et al., 2016). The proximity of wavelength 385 to UV-A and a higher generation of ROS could be involved in this higher activity. For example, while this mechanism has been largely attributed to UV-B, Lawrence et al. (2018) have shown that cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) can be generated in skin cells after light treatment at 385 and 405 nm, with a higher proportion after the 385-nm treatment. A fortiori, the treatment used here may lead to the degradation of nucleic acids (Almeida et al., 2015). Further investigation will be necessary to determine the part of this degradation with the UHI device. content of intracellular porphyrins has also been linked to the sensitivity to inactivation of fungal species. A concentration-dependent inhibition of spore germination by delta-aminolevulinic acid (a precursor of porphyrins) was observed when spores of *Botrytis cinerea* were exposed to 405-nm light. Free-porphyrins has been detected in the growth medium of *A. niger* spores while a spectroscopic analysis of *A. niger* spores revealed no detectable porphyrin excitation peaks. In fungi, the photoreceptors (e.g., cryptochromes) are involved in light signaling but their role in UV resistance in *Aspergillus fumigatus* has been pointed out (Fuller et al., 2013). One of the most common fungal light responses is the expression of pigments, which may be protective by scavenging UV-generated ROS (Fuller et al., 2015). As observed in bacterial spores, genes involved in porphyrins biosynthesis are light-induced in numerous fungal species. Concentration-dependent inhibition of spore germination by delta-aminolevulinic acid and accumulation of singlet oxygen in the spores was observed when the spores were exposed to 405-nm light. These results suggest that the excitation of endogenous porphyrins and subsequent accumulation of singlet oxygen could partially explain the 405-nm light-mediated photoinactivation of *B. cinerea*.

To illustrate potential applications of high-irradiance blue light treatments on fresh fruits, a high-irradiance blue-light irradiation at 385 nm inhibited *P. digitatum* growth on mandarins. The antifungal effect of UV and blue light irradiation, including on *P. digitatum*, has been reviewed on citrus fruits (Kahramanoğlu et al., 2020). As observed in our study, short-term irradiations of mandarins reduced fungal growth symptoms on the fruits without apparent damages when optimum dosage (irradiance, distance, duration) was adjusted. However, a significant reduction was only observed after 6 days of incubation. It would be interesting to study the effect on a larger proportion of fruit samples to obtain a daily follow-up. Yamaga et al. (2015) have reported a reduction of *P. italicum* growth area after blue light treatment (photon fluency, 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) of satsuma mandarins. Although time of treatment was not specifically mentioned, the work of Yamaga and colleagues was based on a previous study, in which fruits were irradiated for up to 24 h (Liao et al., 2013). The overall fluency received by the samples is consistent with the irradiance dispatched in our study over a 6-day period, the authors observed a delay in fungal growth on treated fruits compared to fruits maintained in the dark. The rate of symptom development of lemon fruits inoculated with *P. digitatum* has been reported to increase faster during incubation (Costa et al., 2019). The fungal reduction observed on mandarins is likely to be correlated to a direct effect of blue light on fungal spores. Other mechanisms related to the response of the fruit to low-irradiance light, such as the accumulation of secondary metabolites, have also been reported to induce resistance to decay (Lafuente & Alférez, 2015). Besides light irradiance, the response to the pathogen depends on the fruit characteristics, the variety and the method of treatment. The light treatment applied in our study was directed to the surface of the product, which is the main reservoir of fungal contaminants. However, other fruits can be contaminated by fungi that grow deeper than the surface. For these contaminations, the penetration depth of light, so called skin-effect, is a major factor of the

efficiency of a light treatment. This effect depends on the type of fruit used and the wavelength of the light treatment (Lammertyn et al., 2000). Moreover, the position of the light source and the background used for the experiment may affect the transmittance properties and the diffusion of light within the fruit (Qian et al., 2016).

Blue light appears as one of the most promising alternatives to agrochemicals to reduce molds on fruits, especially with short high irradiance treatments. A promising strategy to avoid irradiation-induced damages would then consist in the combination of different measures, such as the use of food-grade photosensitizer (Mukubesa et al., 2022; Yu et al., 2022).

## 5. Conclusion

Due to their resistance to numerous decontamination processes, bacterial and fungal spores are a major concern in food industry. Blue light treatments show a great potential to inactivate these spores and could be an alternative to thermal and chemical treatments. Specifically, UHI light treatments with wavelengths near UV-A (especially 385 nm) induced a rate of inactivation over 4 log<sub>10</sub> CFU/ml on resistant forms of *B. cereus*, *S. cerevisiae* and *Penicillium* spp., within a maximum irradiance period of 30 min. This novel technology could be used as an effective eco-friendly sanitization process in food processing plant. The adjustment of the processing time and irradiance also highlights the potential of this process for the treatment of fresh fruits and vegetables, such as mandarins. Following a 385 nm-treatment, a reduction of mycelial and sporulation areas of 72% and 85%, respectively, has been observed after 6 days of incubation. In the future, the development of LED technology and the use of higher irradiances in pulsed light treatments could increase the efficiency and decrease the energy consumption of this process. These results of this study highlight the potential of an ultra-high irradiance light as an alternative to common methods used for food preservation or surface disinfection.

## CRedit authorship contribution statement

Thibaut They: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft & Writing – review & editing. Laurent Beney: Conceptualization, Writing – review & editing, Cédric Grangeat: Writing – review & editing. Sébastien Dupont: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

This project was financially supported by the National Agency for Research (GreenDeconta Project ANR18-CE21-0004-01), Institut Agro Dijon of Université de Bourgogne Franche-Comté, and the European Regional Development Fund (FEDER 21).

## References

- Almeida, A., Faustino, M., & Tomé, J. (2015). Photodynamic inactivation of bacteria: Finding the effective targets. *Nature Medicines Chemistry*, 7(10), 1221–1224. <https://doi.org/10.1021/acs50495a015>
- Bohm, G. C., Gándara, L., Di Venosa, G., Mamone, L., Buzzola, F., & Casas, A. (2020). Photodynamic inactivation mediated by 5-aminolevulinic acid of bacteria in planktonic and biofilm forms. *Biochemical Pharmacology*, 177(May), Article 114016. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114016>
- Chaves, J. Q., De Paiva, E. P., Rabinovitch, L., & Vivoni, A. M. (2017). Molecular characterization and risk assessment of bacillus cereus sensu lato isolated from ultrahigh-temperature and pasteurized milk marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, 80(7), 1060–1065. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-448>
- Cho, W. L., & Chung, M. S. (2020). Bacillus spores: A review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology*, 29(11), 1447–1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>
- Cieplik, F., Tabezki, L., Buchalla, W., & Maisch, T. (2014). Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00405>
- Collivignarelli, M. C., Abbà, A., Milno, M. C., Carcamo, F. M., Torretta, V., Rada, E. C., & Sorlini, S. (2021). Disinfection of wastewater by uv-based treatment for reuse in a circular economy perspective. Where are we at? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010077>
- Coluccio, A. E., Rodriguez, R. K., Kerman, M. J., & Neiman, A. M. (2008). The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. *PLoS One*, 3(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002873>
- Cortésio, M., Fuchs, F. M., Commichau, F. M., Eichenberger, P., Schuerger, A. C., Nicholson, W. L., Setlow, P., & Moeller, R. (2019). Bacillus subtilis spore resistance to simulated mars surface conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00333>
- Costa, J. H., Bazioli, J. M., de Moraes Pontes, J. G., & Fill, T. P. (2019). Penicillium digitatum infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology*, 123(8), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>
- Denis, T. G. S., Dai, T., & Hamblin, M. R. (2013). Killing bacterial spores with blue light: When innate resistance meets the power of light. *Photochemistry and Photobiology*, 89(1), 2–4. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01233.x>
- Dijksterhuis, J. (2019). Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiology*, 81(December 2017), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>
- Djouali, B., Thwalte, J. E., Laws, T. R., Commichau, F. M., Setlow, B., Setlow, P., & Moeller, R. (2018). Role of DNA repair and protective components in Bacillus subtilis spore resistance to inactivation by 400-nm-Wavelength blue light. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), 1–11.
- Eissa, M. E., Abd El Naby, M., & Beshir, M. M. (2014). Bacterial vs. fungal spore resistance to peroxygen biocide on inanimate surfaces. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy Cairo University*, 52(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.06.003>
- Gerke, J. P., Chen, C. T. L., & Cohen, B. A. (2006). Natural isolates of Saccharomyces cerevisiae display complex genetic variation in sporulation efficiency. *Genetics*, 174(2), 985–997. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.058453>
- Ghate, V. S., Zhou, W., & Yuk, H. G. (2019). Perspectives and trends in the application of photodynamic inactivation for microbiological food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 402–424. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12418>
- Grangeat, C., Lepinois, F., Winckler, P., Perrier-Cornet, J. M., Dupont, S., & Beney, L. (2018). Cell death mechanisms induced by photo-oxidation studied at the cell scale in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02640>
- Hessling, M., Spellerberg, B., & Hoenes, K. (2017). Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths - a review on existing data. *FEMS Microbiology Letters*, 364(2), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw270>
- Hoenes, K., Hess, M., Vatter, P., Spellerberg, B., & Hessling, M. (2018). 405 nm and 450 nm photoinactivation of Saccharomyces cerevisiae. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(4), 142–148. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00023>
- Hornstra, L. M., De Vries, Y. P., De Vos, W. M., & Abee, T. (2006). Influence of sporulation medium composition on transcription of ger operons and the germination response of spores of Bacillus cereus ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3746–3749. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3746-3749.2006>
- Kahramanoğlu, I., Nisar, M. F., Chen, C., Usanmaz, S., Chen, J., & Wan, C. (2020). Light: An alternative method for physical control of postharvest rotting caused by fungi of citrus fruit. *Journal of Food Quality*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8821346>
- Khan, U. M., Sameen, A., Aadil, R. M., Shahid, M., Sezen, S., Zamrati, A., Ozdemir, B., Sevindik, M., Kaplan, D. N., Selamoglu, Z., Ydyrys, A., Anitha, T., Kumar, M., Sharifi-Rad, J., & Butnariu, M. (2021). Citrus genus and its waste utilization: A review on health-promoting activities and industrial application. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/2488804> (special issue).
- Kumar, A., Ghate, V., Kim, M., Zhou, W., Hoon, G., & Yuk, H. (2015). Kinetics of bacterial inactivation by 405 nm and 520 nm light emitting diodes and the role of endogenous coproporphyrin on bacterial susceptibility. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.005>
- Lafuente, M. T., & Alférez, F. (2015). Effect of LED blue light on Penicillium digitatum and Penicillium italicum strains. *Photochemistry and Photobiology*, 91(6), 1412–1421. <https://doi.org/10.1111/php.12519>
- Lafuente, M. T., Alférez, F., & González-Candelas, L. (2018). Light-emitting diode blue light alters the ability of Penicillium digitatum to infect citrus fruits. *Photochemistry and Photobiology*, 94(5), 1003–1009. <https://doi.org/10.1111/php.12929>
- Lammertyn, J., Peirs, A., De Baerdemaeker, J., & Nicolaï, B. (2000). Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment. *Postharvest Biology and Technology*, 18(2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(99\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(99)00071-X)

- Lang, E., They, T., Peltier, C., Colliau, F., Adamuz, J., Grangeteau, C., Dupont, S., & Beney, L. (2022). Ultra-high irradiance (UHI) blue light: Highlighting the potential of a novel LED-based device for short antifungal treatments of food contact surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(1), 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11718-9>
- Lawrence, K. P., Douki, T., Sarkany, R. P. E., Acker, S., Herzog, B., & Young, A. R. (2018). The UV/visible radiation boundary region (385–405 nm) damages skin cells and induces “dark” cyclobutane pyrimidine dimers in human skin in vivo. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30738-6>
- Lawrence, K. P., Sarkany, R. P. E., Acker, S., Herzog, B., & Young, A. R. (2022). A new visible light absorbing organic filter offers superior protection against pigmentation by wavelengths at the UVR-visible boundary region. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 227(November 2021), Article 112372. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112372>
- Lee, S. Y., Park, H. H., & Min, S. C. (2020). Pulsed light plasma treatment for the inactivation of *Aspergillus flavus* spores, *Bacillus pumilus* spores, and *Escherichia coli* O157:H7 in red pepper flakes. Disinfection of red pepper flakes using pulsed light plasma. *Food Control*, 118(March), Article 107401. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107401>
- Liao, H. L., Alferrez, F., & Burns, J. K. (2013). Assessment of blue light treatments on citrus postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 81, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.019>
- Liu, H., Bergman, N. H., Thomason, B., Shallom, S., Hazen, A., Crosso, J., Rasko, D. A., Ravel, J., Read, T. D., Peterson, S. N., Yates, J., & Hanna, P. C. (2004). Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. *Journal of Bacteriology*, 186(1), 164–178. <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.164-178.2004>
- Lui, G. Y., Roser, D., Corkish, R., Ashbolt, N. J., & Stuetz, R. (2016). Point-of-use water disinfection using ultraviolet and visible light-emitting diodes. *Science of the Total Environment*, 553, 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.039>
- Lv, R., Liu, D., & Zhou, J. (2021). Bacterial spore inactivation by non-thermal technologies: Resistance and inactivation mechanisms. *Current Opinion in Food Science*, 42, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.014>
- Maclean, M., McKenzie, K., Anderson, J. G., Gettinby, G., & MacGregor, S. J. (2014). 405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control. *Journal of Hospital Infection*, 88(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.06.004>
- MacLean, M., Murdoch, L. E., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2013). Sporocidal effects of high-intensity 405 nm visible light on endospore-forming bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 89(1), 120–126. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01202.x>
- Malik, S. A., Swee, T. T., Malek, N. A. N. N., Abdul Kadir, M. R., Emoto, T., Akutagawa, M., Meng, L. K., Hou, T. J., & Tengku Alang, T. A. I. (2017). Comparison of standard light-emitting diode (LED) and 385 nm ultraviolet A LED (UVA-LED) for disinfection of *Escherichia coli*. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 13(4–2), 430–437. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v13n4-2.758>
- Mukubesa, N., Nguenha, R., Hong, H. T., Seiddamyeh, M., Netzel, M. E., & Sultanbawa, Y. (2022). Curcumin-based photosensitization, a green treatment in inactivating *Aspergillus flavus* spores in peanuts. *Food*, 11(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods11030354>
- Murdoch, L. E., McKenzie, K., Maclean, M., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2013). Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus Niger*. *Fungal Biology*, 117(7–8), 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.05.004>
- Nakpan, W., Yermakov, M., Indugula, R., Reponen, T., & Grinshpun, S. A. (2019). Inactivation of bacterial and fungal spores by UV irradiation and gaseous iodine treatment applied to air handling filters. *Science of the Total Environment*, 671, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.310>
- Pacheco, M., Dikec, J., Winckler, P., Coelho, C., & Perrier-Cornet, J. M. (2022). Spectroscopic and microscopic characterization of dipicolinic acid and its salt photoproducts – a UVc effect study on DPA in solution and in bacterial spores. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 280(April), Article 121502. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121502>
- Plavskii, V. Y., Mikulich, A. V., Tretyakova, A. I., Leusenka, I. A., Plavskaya, L. G., Kazuyichis, O. A., Dobysh, I. I., & Krasnenkova, T. P. (2018). Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183(February), 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.021>
- Probst, C., Njapau, H., & Cotty, P. J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2762–2764. <https://doi.org/10.1128/AEM.02370-06>
- Qian, M., Wang, Q., Chen, L., Huang, W., Fan, S., & Zhang, B. (2016). Penetration depth of near-infrared light in small, thin-skin watermelon. *IET Advances in Information and Communication Technology*, 479, 194–201. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48354-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48354-2_21)
- Rachon, G., Raleigh, C. P., & Pawlowsky, K. (2021). Heat resistance of yeast ascospores and their utilisation for the validation of pasteurisation processes for beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(2), 149–159. <https://doi.org/10.1002/jib.646>
- Rapacka-Zdonczyk, A., Wozniak, A., Pieranski, M., Wozniak, A., Bielawski, K. P., & Grinholc, M. (2019). Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sub-lethal treatment. *Scientific Reports*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45962-x>
- Rozali, S. N. M., Milani, E. A., Deed, R. C., & Silva, F. V. M. (2017). Bacteria, mould and yeast spore inactivation studies by scanning electron microscope observations. *International Journal of Food Microbiology*, 263(October), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.008>
- Saleh-Lakha, S., Leon-Velarde, C. G., Chen, S., Lee, S., Shannon, K., Fabri, M., Downing, G., & Keown, B. (2017). A study to assess the numbers and prevalence of *Bacillus cereus* and its toxins in pasteurized fluid milk. *Journal of Food Protection*, 80(7), 1085–1089. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-521>
- Schaeffer, A. B., & Fulton, M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(194), 14.
- Sousa, V., Gomes, A. T. P. C., Freitas, A., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., & Almeida, A. (2019). Photodynamic inactivation of *Candida albicans* in blood plasma and whole blood. *Antibiotics*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040221>
- Sulker, I. M., Arkelstijn, G. J. A., Zeegers, P. J., & Wösten, H. A. B. (2021). Presence of *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *diastaticus* in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. *International Journal of Food Microbiology*, 347(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109173>
- Taylor, W., Camilleri, E., Craft, D. L., Korza, G., Granados, M. R., Peterson, J., Szczepaniak, R., Weller, S. K., Moeller, R., Douki, T., Mok, W. W. K., & Setlow, P. (2020). DNA damage kills bacterial spores and cells exposed to 222-Nanometer UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.03039-19>
- Tehrani, N., Kumar, N., Raghun, H. V., & Vashishth, A. (2018). Biomarkers of bacterial spore germination. *Annals of Microbiology*, 68(9), 513–523. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1361-z>
- Yamaga, I., Takahashi, T., Ishii, K., Kato, M., & Kobayashi, Y. (2015). Suppression of blue mold symptom development in satsuma Mandarin fruits treated by low-intensity blue led irradiation. *Food Science and Technology Research*, 21(3), 347–351. <https://doi.org/10.3136/fstr.21.347>
- Yoshino, F., & Yoshida, A. (2018). Effects of blue-light irradiation during dental treatment. *Japanese Dental Science Review*, 54(4), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.06.002>
- Yu, X., Zou, Y., Zhang, Z., Wei, T., Ye, Z., Yuk, H. G., & Zheng, Q. (2022). Recent advances in antimicrobial applications of curcumin-mediated photodynamic inactivation in foods. *Food Control*, 138(March), Article 108986. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108986>