



# Effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite

Marjorie Saubusse

## ► To cite this version:

Marjorie Saubusse. Effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2007. Français. NNT : 2007CLF21741 . tel-00717826

**HAL Id: tel-00717826**

**<https://theses.hal.science/tel-00717826>**

Submitted on 13 Jul 2012

**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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
N° D.U. 1741

UNIVERSITE D'Auvergne  
ANNEE 2007

*ECOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*  
N° d'ordre 455

## *Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE  
(SPECIALITE : NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS)

Soutenue le 30 Mars 2007

Marjorie SAUBUSSE

---

**Effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de  
*Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite**

---

Président : M. G. FONTY, Directeur de Recherches, Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand

Rapporteurs : M<sup>elle</sup> M. GUEGUEN, Professeur, Université de Caen Basse Normandie  
M. M. GAUTIER, Professeur, ENSAR, Université de Rennes

Membres : Mme S. HULIN, Chargée de Recherches Développement, Pôle fromager AOC Massif  
Central, Aurillac  
M<sup>elle</sup> M.C. MONTEL, Directeur de Recherches, INRA Aurillac, Directeur de thèse

Unité de Recherches Fromagères – Institut National de la Recherche Agronomique - Aurillac



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Marie-Christine Montel, directrice de l'unité de Recherches Fromagères de l'INRA Aurillac et directeur de thèse, qui a su me conseiller efficacement tout en me laissant travailler librement. Merci pour son aide prodiguée tout au long de ce travail de recherche qui m'a permis de mener à bien cette étude.

Merci à Gérard Fonty qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury de thèse. Je remercie tous particulièrement Micheline Guéguen, Professeur à l'Université de Caen Basse Normandie, et Michel Gautier, Professeur à l'Université de Rennes, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens également à remercier Sophie Hulin, Chargée de Recherches Développement au Pôle fromager AOC Massif Central d'Aurillac d'avoir acceptée de participer au jury de cette thèse.

Merci à la Région Auvergne pour avoir financé cette thèse dans le cadre d'une bourse INRA-Région Auvergne. Je remercie ARILAIT RECHERCHES et le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière pour le financement d'une partie de ce travail. Merci également au Syndicat de fromage Saint-Nectaire.

Je remercie Solange Buchin et Christophe Salomon, l'INRA de Poligny pour l'analyse des composés volatils et leur accueil d'une semaine.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur amitié et leur aide pendant ces trois années de thèse. En effet, ces travaux ont été réalisés à l'Unité de Recherches Fromagères de l'INRA Aurillac avec la contribution de.

Liliane Millet pour la coordination des expérimentations dans le cadre du programme AQS,  
Cécile Callon et Anne Lise Pissavy pour l'identification microbienne,  
Robert Didienne et René Lavigne pour les fabrications fromagères,  
Charlène Dufour, stagiaire IUT, Mario Bega de Paiva, stagiaire Université de Sao Paulo, Olivier Mathia, Béatrice Desserre pour les analyses microbiologiques ou biochimiques,  
Héloïse Driquert, stagiaire CNAM co-encadrée par Céline Delbès, pour les analyses SSCP des colonies collectées sur les milieux de culture.

Merci donc à Liliane, Céline, Cécile, Isabelle, Michèle, Béatrice, René et Robert.

Je tiens à témoigner tout particulièrement ma sympathie et ma reconnaissance à mes petits : Charlène, Mario et Olivier pour leur soutien et pour tous les bons petits moments que nous avons partagé. Merci aussi à Hélo, Emilie, Lucie, Jean-Louis, J.M et Lala.

Enfin, j'adresse une pensée particulière à Jomaa, صديقي, avec qui j'ai eu le plaisir de partager de nombreuses discussions philosophiques. Respect.

.



## SOMMAIRE

<b>1. Introduction</b>	1
<b>2. Etude bibliographique</b>	3
2.1. Les microorganismes pathogènes	3
2.1.1. <i>Salmonella</i>	3
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.2.1. Généralités	4
2.2.2. Pouvoir pathogène de <i>L. monocytogenes</i>	5
2.2.3. Incidence de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les produits laitiers	6
2.2.4. Comportement de <i>L. monocytogenes</i> dans les fromages	6
2.3. Moyens de contrôle et d'inhibition de la croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> en lait et en fromages	8
2.3.1. Hazard Analysis Control Critical Point (HACCP)	8
2.3.2. Technologies de barrière ou effets combinés	9
2.3.3. Microorganismes du fromage et leur activité antilisteria	15
2.3.4. Combinaisons de facteurs biotiques et abiotiques pour inhiber <i>L. monocytogenes</i>	26
2.3.5. Modélisation de la croissance de <i>L. monocytogenes</i>	27
<b>3. Matériel et Méthodes</b>	29
3.1. Fabrication des fromages	29
3.1.1. Fabrication de fromages au lait cru	29
3.1.2. Fabrication de fromages au lait cru, au lait microfiltré, au lait microfiltré inoculé avec de la flore microbienne	30
3.1.3. Fabrication de fromages au lait cru et au lait pasteurisé	32
3.1.4. Fabrication de fromages au lait pasteurisé inoculé avec différentes souches bactériennes	33
3.1.5. Fabrications de fromages au lait pasteurisé inoculé avec des communautés microbiennes reconstituées plus ou moins complexes	34
3.2. Analyse des populations microbiennes	36
3.2.1. Choix des méthodes	36
3.2.2. Microbiologie classique	36
3.2.3. Préparation des acides nucléiques avant analyse par Single Strand Conformation Polymorphism	38
3.2.4. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	39
3.3. Paramètres physico-chimiques	40



3.4. Dosages des acides et des sucres-----	40
3.4.1. Préparation des échantillons de fromage pour le dosage des acides et sucres par méthode enzymatique-----	40
3.4.2. Préparation des échantillons de fromage pour le dosage des acides et sucres par High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-----	41
3.5. Analyses des composés volatils-----	41
3.5.1. Analyse avec extraction par « purge and trap »-----	42
3.5.2. Analyse avec extraction en SPME-----	42
3.6. Analyse de l'effet de la température, du pH et des teneurs en acide lactiques D et L sur le comportement de <i>L. monocytogenes</i> -----	43
3.6.1. Protocole expérimental-----	43
3.6.2. Préparation de la souche de <i>L. monocytogenes</i> et des milieux de culture -----	43
3.6.3. Dénombrement de <i>L. monocytogenes</i> -----	44
3.6.4. Activité antilisteria en milieu gélosé de certains alcools, esters et furanes-----	44
3.7. Analyse statistique -----	44
<b>4. Résultats -----</b>	<b>46</b>
4.1. Chapitre 1 : Les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber le développement de <i>L. monocytogenes</i> dans des fromages au lait cru ?-----	46
4.2. Chapitre 2 : Effet de l'épuration des laits sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> -----	47
4.2.1. Objectifs-----	47
4.2.2. Résultats-----	47
4.2.3. Conclusions -----	50
4.3. Chapitre 3 : Analyse des populations microbiennes des fromages avec inhibition de <i>L. monocytogenes</i> -----	52
4.3.1. Publication -----	52
4.3.2. Résultats complémentaires : dosage des acides lactiques dans les différents fromages -----	54
4.4. Chapitre 4 : Effet des communautés microbiennes de composition plus ou moins complexe sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> -----	56
4.4.1. PREAMBULE-----	56
4.4.2. RESULTATS DE LA PREMIERE SERIE D'EXPERIMENTATIONS-----	56
4.4.3. Conclusions -----	67
4.4.4. Résultats de la seconde série d'expérimentations-----	67
4.4.5. Synthèse des résultats des deux expérimentations sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> -----	73
4.5. Chapitre 5 : Effet des métabolites sur la croissance de <i>L. monocytogenes in vitro</i> -----	75
4.5.1. Objectifs-----	75
4.5.2. Effets du pH, de la température et des concentrations en acides lactiques L et D	





sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> -----	75
4.5.3. Activité antilisteria en milieu gélosé de certains alcools, esters et furanes-----	76
4.5.4. Conclusions -----	76
<b>5. Conclusions et perspectives</b> -----	78
<b>Références bibliographiques</b> -----	83
<b>Annexes</b>	



# INTRODUCTION



# 1. Introduction

Le « fromage » est un terme réservé au « produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière : lait, lait partiellement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage et après élimination partielle de la partie aqueuse (directive n°88-1206, 30 décembre 1988, article 1<sup>er</sup>). La mention au lait cru est indiquée lorsque le fromage est obtenu avec du lait qui n'a pas été chauffé au delà de 40°C et qui n'a subi aucun traitement équivalent à la pasteurisation (art2-Directive CEE 92/46).

Les productions fromagères au lait cru représentent une place importante dans l'économie nationale. Produits de terroir, résultat d'un savoir-faire développé par des civilisations rurales à travers les siècles, elles maintiennent une activité agricole et économique notamment dans les régions de montagnes.

Environ 700000 tonnes de fromages au lait cru sont produites annuellement en Europe, en particulier en France, en Suisse et en Italie. En France, la production de fromages au lait cru s'élevait en 2003 à environ 183505 tonnes (16% de la production totale de fromages) soit un chiffre d'affaire de plus de 7 milliards d'euros (l'Economie laitière en chiffres, CNIEL, 2006).

Afin de maintenir ces productions fromagères traditionnelles au lait cru sur le marché, les fromages doivent répondre aux normes sanitaires exigées par la réglementation en vigueur (application du paquet hygiène 852853-2004). Le respect des normes implique l'application de mesures d'hygiènes rigoureuses au niveau de la production de lait et tout au long de la chaîne alimentaire. Ceci n'est pas sans conséquence sur la qualité microbiologique des laits crus en terme de niveau de flores amenant à qualifier ceux-ci de pauci microbiens. Or, les microorganismes du lait cru sont les agents majeurs de l'élaboration des fromages. Ils interviennent au niveau technologique (caillage du lait, texture du fromage,...), au niveau organoleptique (production d'arômes), au niveau hygiénique (inhibition des microorganismes pathogènes ou indésirables). Ainsi, par disparition de l'effet de barrière exercée par la communauté microbienne, l'implantation de flores pathogènes pourrait être favorisée. Le défi pour les filières au lait cru est de préserver la diversité microbienne ayant un intérêt technologique tout en éliminant les flores potentiellement pathogènes. Le défi ne pourra être relevé que par une connaissance de l'origine des flores microbiennes des laits et une meilleure compréhension des interactions microbiennes en particulier celles régissant l'antagonisme vis à vis des pathogènes.

Les thématiques de l'unité de recherches fromagères ont pour objectifs d'apporter des éléments scientifiques pour répondre à ces enjeux et le sujet de cette thèse s'intègre dans ce contexte. Son objectif est de déterminer si et comment les populations microbiennes des laits crus peuvent faire



barrière à *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite. Le fromage Saint-Nectaire a été pris comme modèle d'étude.

Le manuscrit est organisé en 3 parties.

La première partie, dédiée à l'étude bibliographique, mentionnera tout d'abord les espèces potentiellement pathogènes dans les laits crus puis se focalisera sur l'état des connaissances sur la maîtrise de *L. monocytogenes* par effet de barrière.

La deuxième partie présentera le Matériel et Méthodes afférent aux expérimentations réalisées dans cette thèse. Celles-ci ont essentiellement porté sur des analyses microbiennes et biochimiques de fromages par des approches moléculaires.

La troisième partie relatera les résultats obtenus. Elle est composée de 5 chapitres qui suivent la chronologie du travail. L'ensemble du projet dans lequel s'insère cette thèse visait initialement la compréhension de la faible croissance de *L. monocytogenes* dans des productions fromagères d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) Saint-Nectaire. Ainsi, le premier chapitre avait pour objectif de valider les observations de terrain par des fabrications expérimentales contrôlées. Les travaux présentés dans les chapitres suivants avaient pour objectif de préciser le rôle des communautés microbiennes dans l'inhibition de *L. monocytogenes* par comparaison de communautés microbiennes plus ou moins inhibitrices et par simplifications successives de la composition d'une communauté microbienne d'un lait cru inhibiteur.

Ce rapport se terminera par une conclusion et quelques perspectives.





# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage <sup>1</sup>		Limites <sup>2</sup>		Méthode d'analyse de référence <sup>3</sup>	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
Fromages au lait cru	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 <sup>4</sup> ufc/g	10 <sup>5</sup> ufc/g	EN/ISO 6888-2	Pendant le processus de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre de <i>E. coli</i> le plus élevé	Améliorations de l'hygiène de la production et de la sélection des matières premières. Lorsque des valeurs >10 <sup>5</sup> ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques
	Entérotoxines staphylococciques	5	0	Pas de détection dans 25 g (m=M)		Méthode européenne de dépistage du LCR pour le lait <sup>8</sup>	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation	
Fromages, beurre et crème fabriqués à partir de lait cru ou de lait traité à une température inférieure à celle de la pasteurisation <sup>7</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g (m=M)		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation	
Denrées alimentaires prêtes à consommer pouvant favoriser le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g <sup>4</sup> (m=M)		EN/ISO 11290-2 <sup>5</sup>	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 25 g <sup>6</sup> (m=M)		EN/ISO 11290-1	Avant que l'opérateur produisant cette denrée alimentaire n'en perde la maîtrise immédiate	

**Tableau 1 : Critères microbiologiques des fromages au lait cru (Directives paquet hygiène 852 853-2004)**

<sup>1</sup> n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs supérieures à m ou comprises entre m et M.

<sup>2</sup> m: norme (nombre par gramme), M: seuil de tolérance supérieur (nombre par gramme).

<sup>3</sup> Il y a lieu d'utiliser l'édition la plus récente de la norme.

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

<sup>5</sup> 1 ml d'inoculum est déposé sur une boîte de Petri d'un diamètre de 140 mm ou sur trois boîtes de Petri d'un diamètre de 90 mm.

<sup>6</sup> Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils n'échappent à la maîtrise immédiate de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant toute la durée de conservation.

<sup>7</sup> Excepté les produits pour lesquels le fabricant peut démontrer, à la satisfaction des autorités compétentes qu'en raison du temps d'affinage et de la valeur a<sub>w</sub> du produit, il n'y a aucun risque de contamination par les salmonelles.

<sup>8</sup> Référence: Hennekinne et al., J. AOAC Internat. Vol. 86, No 2, 2003.

## 2. Etude bibliographique

### 2.1. Les microorganismes pathogènes

Les microorganismes pathogènes du lait et du fromage sont des microorganismes pour la plupart ubiquitaires qui peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires ou d'intoxinations (intoxication sans infection). Dans les fromages, les microorganismes potentiellement pathogènes qui font l'objet de la réglementation sont *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* producteurs d'entérotoxines et *Listeria monocytogenes*. Les normes européennes en ce qui concerne ces microorganismes dans les fromages au lait cru sont présentées dans le tableau 1.

#### 2.1.1. *Salmonella*

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatifs, capables de se multiplier à des températures comprises entre 5 et 45°C et à des valeurs de pH de 4,5 à 9.

Elles sont à l'origine de la salmonellose qui est l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues.

Le réservoir le plus important en *Salmonella* est l'intestin des animaux (Boudry et al., 2002). Excrétées dans les matières fécales, les *Salmonella* se retrouvent dans l'environnement et contaminent l'eau, le sol et les aliments.

La pasteurisation est suffisante pour tuer un nombre élevé de Salmonelles. La contamination des laits pasteurisés est donc une contamination post-pasteurisation.

#### 2.1.2. *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques sont des coques à Gram positif, catalase positive, aérobies ou anaérobies facultatives. La majorité des souches est capable de se développer en présence de 10% de NaCl et à des températures comprises entre 18 et 40°C.

*Staph. aureus* est la principale espèce entérotoxigène. Seules les espèces pouvant produire des entérotoxines sont capables de provoquer des toxi-infections alimentaires.

La contamination des laits et fromages en *Staph. aureus* a deux origines : l'animal et l'homme. Les mammites sont la principale source de contamination des laits crus en *Staph. aureus*.

*Staph. aureus* peut être détruit par un traitement thermique de 54-60°C pendant 2 à 4 minutes. Cependant, les entérotoxines présentent une grande stabilité à la chaleur et ne sont pas détruites par la



pasteurisation. De plus, les laits pasteurisés peuvent être contaminés par des contaminations humaines après la pasteurisation.

## **2.2. *Listeria monocytogenes***

### **2.2.1. Généralités**

*Listeria monocytogenes* est un bacille (0,4 à 0,5 µm de diamètre et 0,5 à 2µm de longueur) à Gram positif, non sporulé et non capsulé. Sa mobilité, uniquement entre 20 et 25°C, est assurée par une ciliature péritriche. Elle est catalase positive et oxydase négative.

*L. monocytogenes* est capable de coloniser de nombreuses niches écologiques. C'est un des caractères les plus importants pour expliquer sa survie et sa croissance dans les aliments.

L'hétérogénéité phénotypique et génotypique de *L. monocytogenes* a été évoquée pour expliquer l'établissement et la persistance de souches de *L. monocytogenes* à des niches écologiques spécifiques (Lawrence et Gilmour, 1995).

Dans les fromages, l'activité de l'eau est déterminée essentiellement par deux paramètres, la teneur en eau et la teneur en sel. La valeur optimale de l' $a_w$  pour le développement de *L. monocytogenes* est de 0,97 mais sa croissance reste possible jusqu'à des valeurs d' $a_w$  de 0,943.

L'optimum thermique de croissance de *L. monocytogenes* est compris entre 30 et 37°C mais elle est capable de se développer à des températures variant de -2°C à 45°C. Cette large gamme de température est un moyen de survie et de développement efficace dans la nature. *L. monocytogenes* présente également une certaine halotolérance, certaines souches supportant 20% de NaCl. Elle peut croître à des valeurs de pH comprises entre 4,6 et 9 (optimum pH de 7 voire légèrement alcalin). L'halotolérance et la capacité de *L. monocytogenes* à se développer dans une large gamme de température sont deux propriétés qui possèdent un lien physiologique (Ko et al., 1994) et qui expliquent sans doute largement d'une part sa survie et sa croissance dans les aliments réfrigérés et salés et d'autre part sa survie dans les environnements de fabrication des aliments. *L. monocytogenes* diffère de la majorité des bactéries et se distingue de toutes les bactéries pathogènes pour l'homme et l'animal par cette possibilité de croissance étendue sur environ 47°C (Rosso et al., 1993).

Les exigences nutritives modérées de *L. monocytogenes* permettent aussi une croissance en conditions défavorables.

*L. monocytogenes* est une bactérie aérobie-anaérobie facultative, facteur intervenant également dans le caractère adaptatif marqué de l'espèce.

Les facteurs biotiques et abiotiques influençant la croissance de *L. monocytogenes* ainsi que les capacités d'adaptation de *L. monocytogenes* à ces facteurs seront développés dans la partie 2.3.2.2.

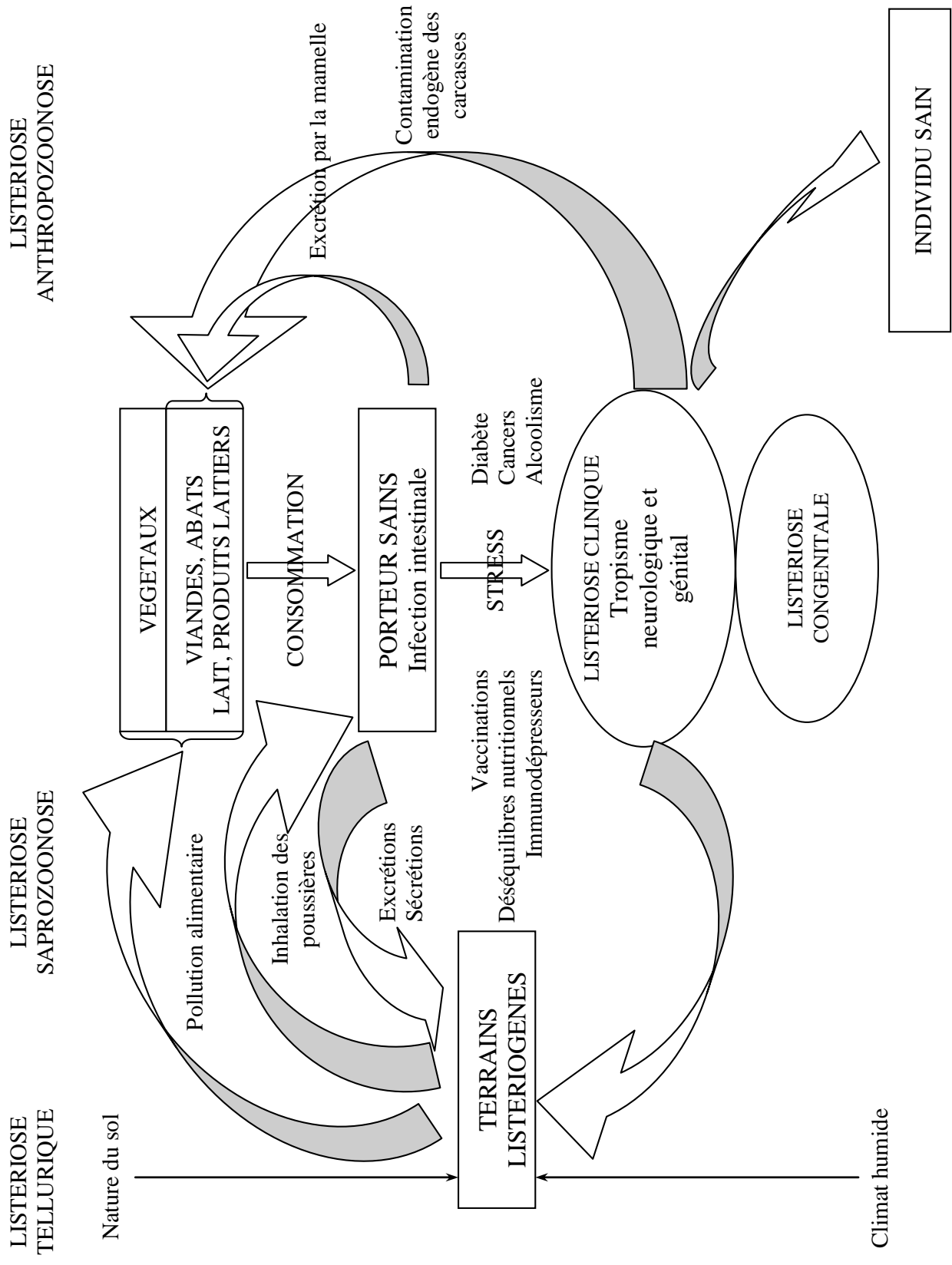


Figure 1 : Schéma épidémiologique des listérioses humaine et animale (Fresse, 1993)

### 2.2.2. Pouvoir pathogène de *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* est un pathogène pour l'homme et les animaux. Le schéma épidémiologique des listérioses humaine et animale est présenté dans la figure 1. La listériose atteint préférentiellement les personnes dont le système immunitaire est déficient, les femmes enceintes, les nouveaux-nés et les personnes âgées (Vazquez-Boland et al., 2001). C'est une maladie rare avec une incidence en 1996 de 0,43 cas pour 100000 habitants (données de l'Institut national de Veille Sanitaire) mais dont les conséquences sont graves. Elle peut se traduire par une méningite, une encéphalite ou une septicémie ayant une issue fatale dans 50% des cas. Chez la femme enceinte atteinte de listériose, les principales conséquences sont l'interruption de grossesse ou un accouchement prématuré.

Lors d'infection, *L. monocytogenes* va envahir les cellules M des plaques de Peyer et/ou les entérocytes. Elle va traverser la barrière intestinale puis va être phagocytée par les macrophages dans lesquels elle va survivre et se multiplier. Elle va ensuite gagner la lymphe et le courant sanguin et infecter le foie et la rate. Les microorganismes qui survivent vont infecter les hépatocytes et pourront être disséminés par voie sanguine.

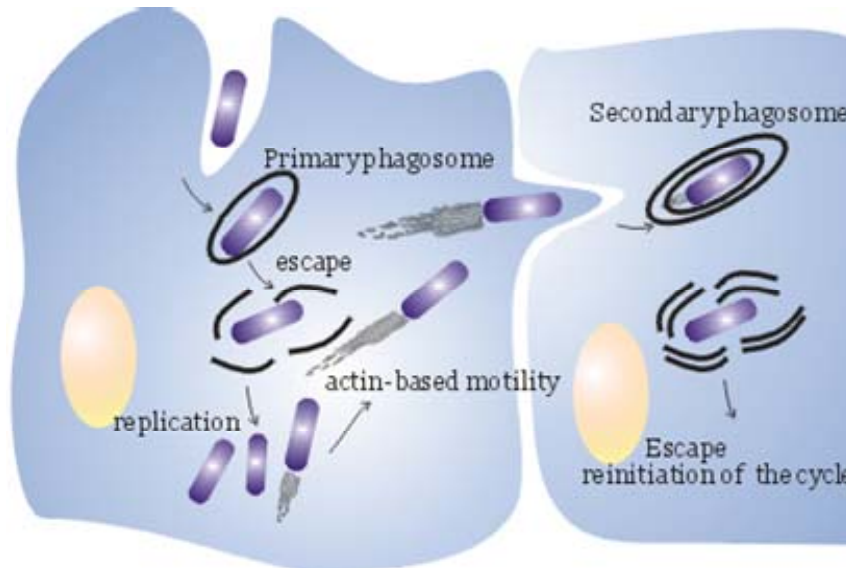
Les principaux gènes de virulence de *L. monocytogenes*, *prfA*, *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA* et *inlB* interviennent dans les différentes étapes du cycle d'infection et vont coder pour des protéines particulières (Figure 2) (Vazquez-Boland et al., 2001 ; Devaux et Hébraud, 2006 ; Hamon et al., 2006).

Le gène *prfA* code pour la protéine PrfA qui est le principal activateur de l'expression des gènes de virulence. L'expression du gène *prfA* est maximale à 37°C.

Les internalines (Inl A et Inl B) sont des protéines qui permettent à la bactérie d'entrer dans les cellules. Après pénétration dans les cellules, *L. monocytogenes* est emprisonnée dans une vacuole intracytoplasmique dont elle va s'échapper pour se multiplier dans le cytosol. La lyse de la vacuole d'internalisation est principalement due à la listériosine O (Kayal et Charbit, 2006) codée par le gène *hly*. *L. monocytogenes* va ensuite coloniser les tissus par diffusion de cellules à cellules. Cette diffusion nécessite la formation d'une queue d'actine qui propulse la bactérie, de manière aléatoire, dans le cytoplasme. La protéine Act A permet la polymérisation des filaments d'actine responsables des mouvements de la cellule de *L. monocytogenes*. Elle joue donc un rôle important dans les mouvements intra- et inter-cellulaires. Sans cette protéine, les mouvements de la cellule de *L. monocytogenes* existent toujours mais sont très lents (Hamon et al., 2006).

Lorsque *L. monocytogenes* va atteindre la membrane cytoplasmique, elle va induire la formation de protubérances cellulaires qui seront phagocytées par la cellule adjacente pour donner naissance à des vacuoles à 2 membranes. Deux phospholipases, PlcA et PlcB, vont jouer un rôle critique pour la lyse de la double vacuole et dans certains cas de la vacuole primaire. Après la lyse des vacuoles,





**Principaux facteurs de virulence de *L. monocytogenes*:**

- [ActA](#)
- [Exoenzyme](#)
  - [PlcA](#)
  - [PlcB](#)
- [Invasion](#)
  - [InlA](#)
  - [InlB](#)
- [Regulation](#)
  - [PrfA](#)
- Protéine de stress
  - [ClpC](#)
  - [ClpE](#)
  - [ClpP](#)
- [Toxine](#)
  - [LLO](#)

**Figure 2 : Schéma du cycle de vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes***

Reproduction du schéma de Vazquez-Boland et al., 2001

*L. monocytogenes* peut initier un autre cycle infectieux, se disséminer au sein d'un tissu sans quitter le cytoplasme, échappant ainsi aux anticorps.

### **2.2.3. Incidence de *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers**

Dans les années 1980, l'émergence de plusieurs cas de listériose a été associée à la consommation de produits laitiers. Entre 1980 et 2000, 10 épidémies de listériose ont été déclarées. Les produits alimentaires, vecteurs de l'agent infectieux, impliqués étaient dans 2 cas du lait pasteurisé, dans 2 autres cas du beurre et dans 6 cas du fromage parmi lesquels 3 épisodes impliquant des fromages au lait cru (De Buyser et al., 2001). Les fromages au lait cru comme les autres types de fromages peuvent être contaminés. En 2001, Rudolph et Scherer ont reporté une plus grande incidence de *L. monocytogenes* dans des fromages mûris au lait pasteurisé (8,0%) que dans les fromages au lait cru (4,8%). Il n'a jamais été clairement démontré que les fromages au lait cru étaient moins sûrs que les fromages au lait pasteurisé (Donnelly et al., 2001). La contamination des fromages fabriqués à partir de lait pasteurisé est généralement due à une contamination post-pasteurisation.

En raison des caractères ubiquistes et psychotrophes de *L. monocytogenes*, les laits et fromages peuvent être contaminés à tous les stades de la chaîne alimentaire : au niveau de la production de lait, en cours de fabrication et lors de l'affinage des fromages. L'origine de la contamination du lait peut-être multiple. Les sources de contamination ont pu être identifiées grâce à l'application de méthodes de typage moléculaire (Lukinmaa et al., 2004). La contamination est soit d'origine endogène (animaux atteints de listériose) soit d'origine exogène (eaux, matières fécales, personnel,...). Le plus fréquemment, les facteurs contribuant à la présence de contaminations dans les laits sont les fèces sécrétées suite à l'ingestion d'aliments contaminés (Husu et al., 1990), une hygiène insuffisante (1,6%), des cross-contaminations (3,6%), une technologie et un stockage dans des salles inadaptées (4,2%), une contamination de l'équipement (5,7%) et une contamination par le personnel (9,2%) (Reij et al., 2004). Lors de l'affinage, la croûte des fromages peut-être inter contaminée par les soins des fromages en cave (Millet et al., 2002).

### **2.2.4. Comportement de *L. monocytogenes* dans les fromages**

La capacité de *L. monocytogenes* à survivre et à se développer dans différents types de fromages fabriqués avec du lait artificiellement contaminé a largement été étudiée.

La croissance de *L. monocytogenes* dans le fromage est fortement liée au type de fromage et à la technologie de fabrication (Grappin et Beuvier, 1997).

Lors de la fabrication de fromage frais (les fromages blancs, le Mascarpone, la Ricotta, ...), la population de *L. monocytogenes*ensemencée avec *Streptococcus cremoris* dans le lait reste stable,



diminue lors du traitement thermique à 57,2°C pendant 30 minutes puis persiste et peut même se développer au cours de la conservation du fromage (Ryser et al., 1996).

Dans les fromages à pâte ferme cuite, *L. monocytogenes* n'est jamais détectée après 1 semaine dans la pâte des fromages de type Emmental (Bachmann et Spahr, 1995), après 66 jours dans un fromage suisse (Buazzi et al., 1992) et après 2 à 6 semaines d'affinage (en fonction de la souche de *L. monocytogenes*ensemencée) dans la pâte des fromages de type Parmesan (Yousef et Marth, 1990). Au contraire, Solano-Lopez et al. (2000) ont observé la survie de *L. monocytogenes* dans un fromage mexicain, le Chihuahua.

Dans les fromages à pâte persillée, la population de *L. monocytogenes* diminue au cours des 50 premiers jours et est stoppée 120 jours après le début de l'affinage (Papageorgiou et Marth, 1989).

Pendant les premières heures de formation du caillé de type Mozzarella, les populations de *L. monocytogenes* étaient 4 fois plus concentrées dans le caillé que dans le lactosérum. Le chauffage du caillé 30 minutes à 40°C provoque une diminution de 38% de la concentration en *L. monocytogenes*. Pendant le cheddarisation du caillé (polymérisation des caséines du caillé en milieu acide), la concentration en *L. monocytogenes* augmente de 25%. Le passage du caillé dans l'eau chaude (77°C) et son étirement pendant 3 à 4 minutes provoque sa complète disparition. *L. monocytogenes* ne survit pas aux conditions de fabrication de la Mozzarella (Buazzi et al., 1992).

Villani et al. (1996) ont, quant à eux, observé une diminution de la quantité de *L. monocytogenes* après l'étirement du caillé dans une eau à 95°C suivie de sa non détection après conservation dans l'eau résultant de l'étirement du caillé.

Les fromages à pâte molle sont favorables à la multiplication de *L. monocytogenes*. Pendant la fabrication du Camembert, malgré l'abaissement du pH à des valeurs de 4,60, *L. monocytogenes* se développe (Ryser et al., 1987). Au cours de l'affinage, le comportement de *L. monocytogenes* est différent en surface et à cœur du Camembert. Dans les fromages à 60 jours, la population de *L. monocytogenes* en surface est 100 fois plus importante qu'au cœur du fromage. Ces résultats corroborent les observations de Ramsaran et al. (1998) qui ont observé que la désacidification de la croûte d'un Camembert en cours d'affinage était associée à une croissance de *L. monocytogenes* plus importante en surface qu'à coeur.

Dans les fromages de type Feta, malgré des valeurs de pH inférieures à 4,30, *L. monocytogenes* survit plus de 90 jours (Liu et al., 2004 ; Papageorgiou and Marth, 1989).

De la même manière Morgan et al., 2001 et Solano et al., 2000 n'ont jamais observée dans le Manchego une inhibition totale de *L. monocytogenes*.



De manière générale, lors de la fabrication de fromages, pendant la formation du caillé, la population de *L. monocytogenes* augmente, les bactéries étant piégées dans les particules du caillé. Seul un faible pourcentage de *L. monocytogenes* se retrouve dans le lactosérum. Suivant le type de fromage, la population de *L. monocytogenes* peut soit rester constante, soit s'accroître pendant les étapes ultérieures d'égouttage, salage et pressage.

Au cours de l'affinage, en fonction de la technologie fromagère utilisée, trois comportements de *L. monocytogenes* se distinguent :

- *L. monocytogenes* est totalement inhibée dans les fromages à pâte filée ou dans certains fromages à pâte pressée cuite.
- la croissance de *L. monocytogenes* est inhibée mais la bactérie survit un temps plus ou moins long. C'est le cas des fromages frais lactiques, des fromages à pâte pressée et de certains bleus.
- *L. monocytogenes* est capable de se développer comme observé dans les fromages à pâte molle.

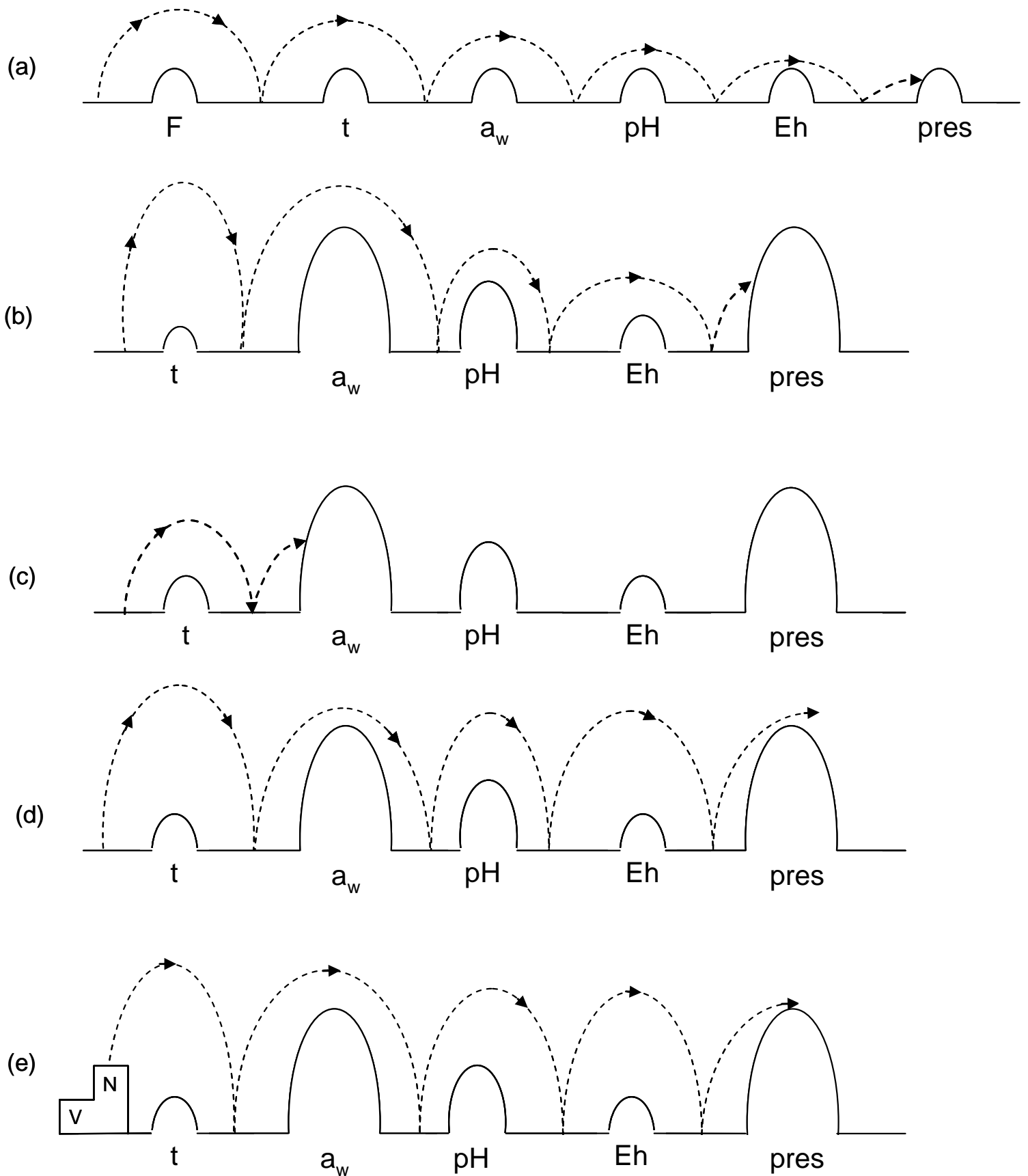
Les fromages dans lesquels *L. monocytogenes* n'est jamais totalement inhibée sont appelés des fromages sensibles car leur technologie de fabrication et d'affinage et leurs caractéristiques propres font que le développement ou le maintien des bactéries pathogènes y est possible. Une meilleure maîtrise de *L. monocytogenes* implique de limiter les contaminations des fromages et de contrôler sa multiplication tout au long du process. Le comportement de *L. monocytogenes* dépend de différents facteurs tels que la nature, la quantité et l'activité de la flore fermentaire, les valeurs de pH, les teneurs en acides organiques (lactique, acétique, formique), l' $a_w$ , les concentrations en nutriments et en oxygène, la température d'affinage, la présence d' $H_2O_2$  et d'autres agents anti-microbiens.

## **2.3. Moyens de contrôle et d'inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* en lait et en fromages**

### **2.3.1. Hazard Analysis Control Critical Point (HACCP)**

L'établissement de mesures d'hygiènes rigoureuses (Good Agricultural Practices, Good Hygienic Practices and Good Manufacturing practices), de méthodes de contrôle et de détection plus rapides et plus efficaces a permis une nette diminution de la contamination des laits et des fromages par *L. monocytogenes*.

Le terme HACCP a été introduit pour la première fois dans la directive européenne 93/43/CE en 1993. Aujourd'hui, cette méthodologie est considérée au niveau international comme un outil efficace pour traiter les risques sanitaires qui peuvent survenir lors de la production des aliments (Cerf et al., 1996).



**Figure 3 : Cinq exemples d'effets barrière utilisés pour la conservation des aliments.** Chaque effet barrière peut être utilisé simultanément ou séquentiellement, selon le type de barrière et le procédé de fabrication. Les symboles ont les significations suivantes : F = chauffage, t = réfrigération,  $a_w$  = activité de l'eau, pH, Eh = potentiel redox, pres = conservateur, V = vitamines, N = nutriments.

Il est largement reconnu que l'application de la HACCP peut être retardée en particulier dans les Petites et Moyennes Entreprises par un manque de temps, d'expertise, de stage, de motivation et d'engagement (Bertolini et al., 2006).

Le système d'analyse des risques et de maîtrise de points critiques (Hazard Analysis Control Critical Point) est une démarche systématique et organisée, permettant, dans un processus de production de produits alimentaires, de renforcer la prévention et d'identifier les points où une intervention sera nécessaire pour réduire les risques à un niveau acceptable (Parguel, 2006).

Pour cela, la démarche consiste, par analyse des risques, à repérer les moments ou les opérations critiques, et à les éliminer ou les contrôler. De fait, cette méthode est devenue une norme et est maintenant imposée par des directives des autorités européennes pour l'hygiène alimentaire. La méthode HACCP repose sur sept principes : procéder à une analyse des dangers, déterminer les points critiques à maîtriser (CCP), fixer le ou les seuil(s) critique(s), mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP, déterminer les mesures correctives à prendre en compte lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est pas maîtrisé, appliquer des procédures de vérification afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement, constituer un dossier dans lequel figurent toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application.

### **2.3.2. Les technologies de barrière ou effets combinés**

#### **2.3.2.1. Le concept**

La technologie de barrière est une stratégie qui devrait permettre d'assurer la sécurité sanitaire des aliments tout en conservant leurs qualités organoleptiques. Elle consiste en l'utilisation de différents facteurs qui combinés permettent une meilleure maîtrise du développement microbien y compris celui des pathogènes.

Une barrière est définie comme une condition environnementale, un facteur ou une étape du procédé qui limite, retarde ou prévient la croissance microbienne (effet microbiostatique) et/ou réduit la charge microbienne (effet microbiocide).

Plus une barrière est haute, plus l'effort du microorganisme pour la franchir est important. Cependant l'utilisation d'une seule barrière peut s'avérer, en fonction de son intensité, soit insuffisante pour assurer la sécurité sanitaire des aliments, soit trop importante et avoir des effets négatifs et altérer le goût des aliments. L'objectif de la technologie de barrière est donc de raisonner la combinaison des actions simultanées ou séquentielles de différentes barrières afin de contrôler le développement des microorganismes pathogènes telle que *L. monocytogenes* (Figure 3). La figure 3 illustre l'effet de barrière au travers de 6 exemples théoriques. Dans l'exemple 3a, toutes les barrières ont la même intensité. Il met en évidence qu'un microorganisme est capable de franchir un certain nombre de





barrières mais ne peut pas surmonter tous les obstacles. Au contraire, dans l'exemple 3b, les barrières ont des intensités différentes et les facteurs  $a_w$  et conservateurs sont ceux qui agissent principalement pour contrôler le microorganisme. Si les concentrations en microorganismes sont faibles au départ, moins de barrières ou bien des barrières de plus faibles intensités suffisent pour maîtriser le microorganisme comme l'illustre la figure 3c. Par contre, si la quantité du microorganisme au départ est plus importante (Figure 3d) ou si l'aliment est riche en nutriments et vitamines (Figure 3e), il peut franchir les barrières. Dans ce cas, d'autres barrières ou des barrières de plus haute intensité sont nécessaires pour assurer le contrôle du microorganisme.

Au cours de la transformation et de la conservation des aliments, *L. monocytogenes* peut rencontrer de nombreux facteurs capables d'affecter sa croissance. Les conditions de stress auxquelles doit faire face *L. monocytogenes* dans les procédés de fabrication alimentaire sont le déficit alimentaire, le stress osmotique, le stress thermique, l'acidité,... (Paragraphes 2.3.2.2 et 2.3.2.3). Les étonnantes capacités de *L. monocytogenes* à développer des mécanismes physiologiques et génétiques d'adaptation en particulier au stress osmotique, au stress froid et au stress acide pourraient expliquer sa survie et sa croissance dans les aliments. Les systèmes de réponses élaborés par *L. monocytogenes* pour survivre aux différentes conditions environnementales varient selon le stress rencontré (Figure 4).

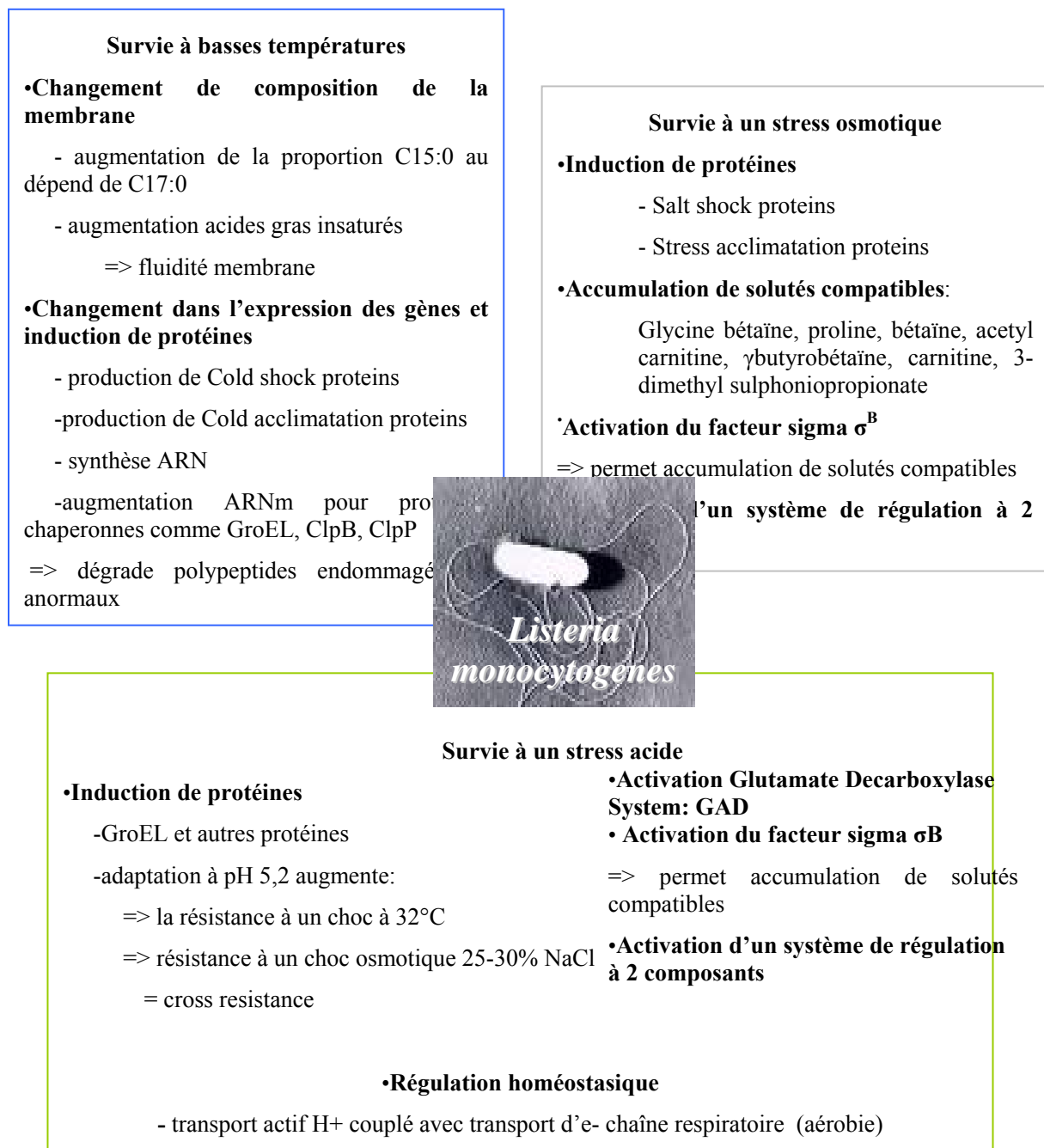
Ces systèmes de réponse nécessaires pour survivre aux procédés de fabrication peuvent également être requis pour coloniser l'hôte durant l'infection.

Afin de contrecarrer les phénomènes de résistance et d'adaptation de *L. monocytogenes*, une approche « multicible » a émergé. L'approche « multicible » consiste à faire agir les barrières au même moment sur différentes cibles en affectant par exemple à la fois, la membrane cellulaire, le matériel génétique, le système enzymatique et le système homéostatique. Cette approche « multicible » est souvent plus efficace qu'une simple cible et permet l'utilisation de barrières de plus basses intensités, et de ce fait ayant moins d'effets sur la qualité du produit. Ainsi, il est possible que les différentes barrières dans un aliment n'aient pas juste un effet additif mais puissent agir synergiquement.

De façon pratique, ceci pourrait vouloir dire qu'il est plus efficace d'utiliser une combinaison de différents facteurs avec de faibles intensités qui vont affecter des systèmes microbiens différents ou agir synergiquement que d'utiliser un seul facteur de conservation avec une forte intensité. De plus, dans le concept de technologie de barrière, l'objectif est plus d'inhiber la croissance et la prolifération des microorganismes indésirables plutôt que de les éliminer.

L'emploi d'une telle stratégie nécessite la connaissance de l'impact de chacun des facteurs seuls et en interactions. Plus de 60 facteurs ont déjà été décrits (Leistner, 2000). Ils peuvent être classés en deux groupes, les facteurs abiotiques et les facteurs biotiques

#### **2.3.2.2. Les facteurs abiotiques affectant la croissance et la survie de**



**Figure 4 : Exemples de réponses de *L. monocytogenes* à des stress environnementaux : stress acide, basses températures et osmotique (Gandhi et al., article sous presse).**

### ***L. monocytogenes* dans les laits et fromages (Figure 5)**

L'adjectif abiotique signifie qui n'a pas trait à la vie. Un facteur abiotique est un facteur écologique non lié aux êtres vivants. Les facteurs abiotiques sont des facteurs physiques ou chimiques qui peuvent influencer sur les organismes vivants.

#### **2.3.2.2.1. La température**

*L. monocytogenes* est considérée comme une bactérie psychrotolérante, capable de se développer à des températures comprises entre -2°C et 45°C.

Sa survie et sa croissance aux températures de réfrigération (2-4°C) sont deux facteurs parmi d'autres qui rendent le contrôle de ce pathogène difficile (Rocourt et Cossart, 1997). Trois types de réponses adaptatives à basse température ont été décrites chez *L. monocytogenes* (Figure 4). La première correspond à ajustement de la fluidité membranaire par un changement de composition en acides gras membranaires. Un des principaux changements est une augmentation de la proportion de C<sub>15:0</sub> aux dépens du C<sub>17:0</sub>, quand la température est inférieure à 7°C. La croissance à basses températures entraîne également une augmentation du degré d'acides gras insaturés (Beales, 2004). La seconde est révélée par un changement dans l'expression des gènes et l'induction de protéines. *L. monocytogenes* produit des « Cold shock proteins » (Csps) en réponse à un choc froid et des « Cold acclimation proteins » (Caps) sont synthétisées lors d'une acclimatation à basses températures (Bayles et al., 1996). L'acclimatation au froid est souvent accompagnée de changements de l'expression des gènes. GroEL, ClpP et ClpB sont des protéases qui pourraient être impliquées dans la dégradation de polypeptides anormaux ou endommagés en raison des basses températures (Liu et al., 2002). La troisième se traduit par une accumulation des solutés compatibles de l'environnement.

De la même manière, grâce, entre autre, à la production de « Heat Shock Proteins » (HSP), *L. monocytogenes* survit aux hautes températures. La préadaptation de la cellule à une température sublétales peut augmenter sa résistance à un stress thermique ultérieur de plus forte intensité (Lindquist et al., 1986). Ainsi, un chauffage à 48°C pendant 10 min permet aux cellules de *L. monocytogenes* de résister à de hautes températures (50, 55, 60 et 65°C) contrairement aux cellules non préchauffées (Linton et al., 1992).

Bien qu'une résistance à la pasteurisation ait pu être mise en évidence avec de fortes concentrations bactériennes, une pasteurisation à 72°C pendant 30 secondes est suffisante pour éliminer *L. monocytogenes* (Lemaire et al., 1989). La pasteurisation telle que définie par le « Codex code of hygienic practices of dried milk » est un procédé de conservation qui ramène le nombre de *L. monocytogenes* du lait à des niveaux qui ne comportent plus de risque pour la santé humaine. Les autres méthodes appliquant des chaleurs plus intenses, telles que la stérilisation ou l'appertisation sont

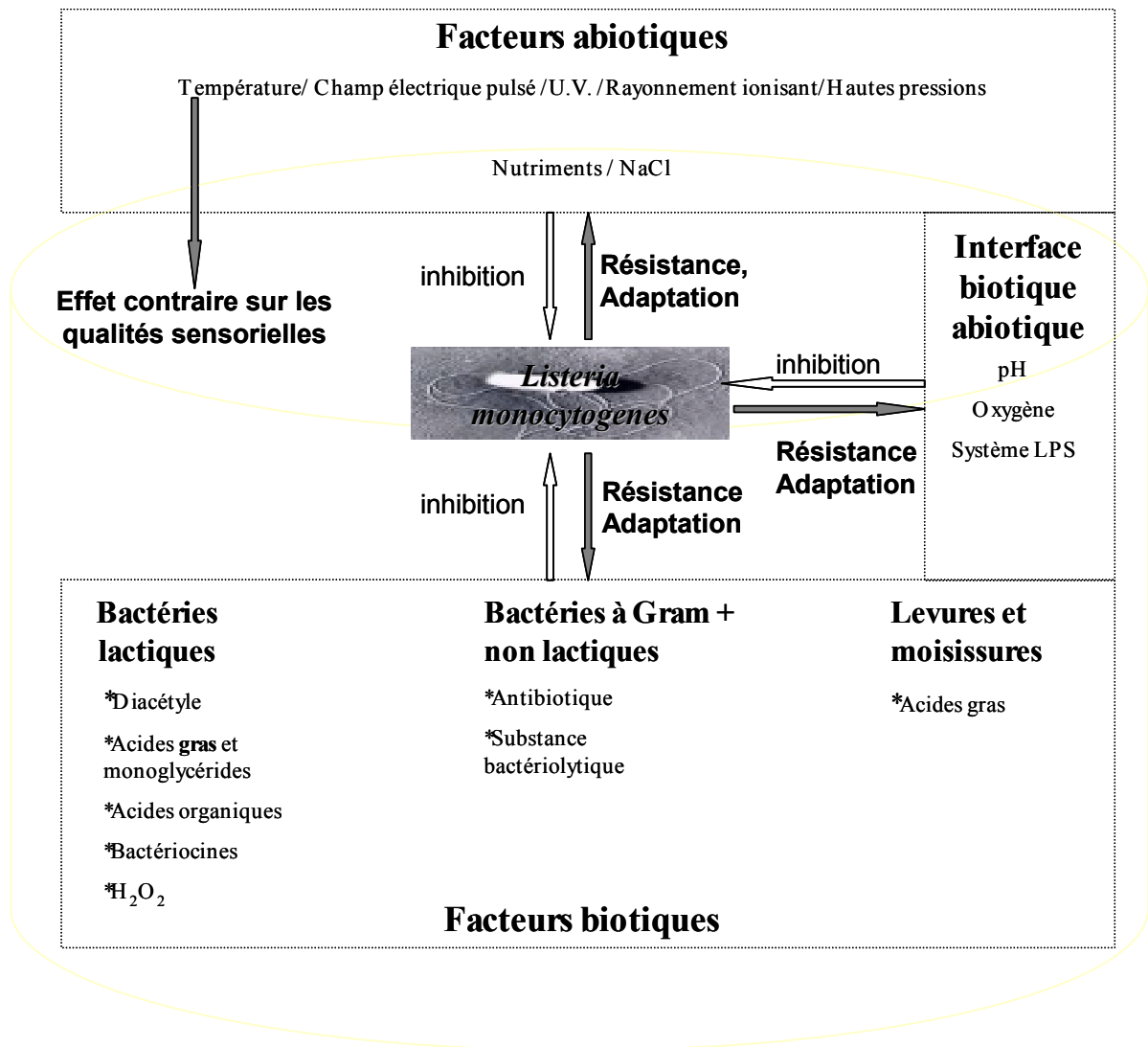


Figure 5 : Schéma des facteurs biotiques et abiotiques capables d'affecter la croissance de *L. monocytogenes* en fromages

efficaces contre *L. monocytogenes* (Lemaire et al., 1989). Un chauffage au micro-onde au-delà de 70°C pendant 2 minutes semble moins efficace que les autres moyens de cuisson (Coote et al., 1991). Cependant, ces traitements du lait peuvent altérer les qualités sensorielles des fromages et ne préviennent pas des contaminations à tous les stades de la chaîne alimentaire.

#### **2.3.2.2.2. Le NaCl**

*L. monocytogenes* présente également une certaine halotolérance, certaines souches supportant 20% de NaCl.

Vis-à-vis d'un choc hyperosmotique, l'accumulation de K<sup>+</sup> peut constituer la réponse primaire de *L. monocytogenes*. Ce serait une réponse à court terme et transitoire dans laquelle le gène *KdpE* est impliqué. La réponse secondaire, réponse à long terme, consiste en une accumulation de solutés compatibles telle que la glycine bêtaïne. Après la glycine bêtaïne, la carnitine est l'osmolyte le plus efficace chez *L. monocytogenes* dans des conditions de basses osmolarité (2% de NaCl). Le facteur général de stress sigma B joue un rôle essentiel dans la coordination de la réponse osmotique chez *L. monocytogenes* en dirigeant la transcription des gènes codant pour les transporteurs de solutés.

#### **2.3.2.2.3. L'activité de l'eau (a<sub>w</sub>)**

Dans les fromages, l'activité de l'eau est déterminée essentiellement par deux paramètres, la teneur en eau et la teneur en sel. La valeur optimale de l'a<sub>w</sub> pour le développement de *L. monocytogenes* est de 0,97 mais sa croissance reste possible jusqu'à des valeurs d'a<sub>w</sub> de 0,943 (Petran et Zottolla, 1989). Dans la plupart des fromages au stade de leur commercialisation, l'activité de l'eau est généralement supérieure à 0,943 (Le fromage, 1997). Bien que l'a<sub>w</sub> à elle seule ne semble pas suffisante pour affecter la croissance de *L. monocytogenes* en fromages, elle pourrait contribuer à son inhibition en présence d'autres facteurs.

#### **2.3.2.2.4. Les carences nutritionnelles**

Dans l'environnement, les nutriments sont généralement présents en quantité limitante. Peu d'études ont été réalisées sur l'impact de la carence nutritionnelle sur *L. monocytogenes*.

Il est cependant connu que les exigences nutritives de *L. monocytogenes* sont modérées, lui permettant une croissance en conditions défavorables. *L. monocytogenes* fermente le fructose, le mannose, le cellobiose, le maltose et le glucose. Le glucose est le sucre préférentiellement consommé conduisant à la formation d'acides lactique et/ou acétique en conditions aérobies et uniquement à la production d'acide lactique en anaérobiose (Pine et al., 1989). Le lactose et le galactose ne sont fermentés que par certaines souches de *L. monocytogenes* (Mira-Gutierrez et al., 1990, Margolles et al., 2000). Le citrate



de fer stimule sa croissance (Premaratne et al., 1991). La multiplicité des sources de fer est sans doute aussi un facteur de la large adaptation aux environnements divers, de la terre aux végétaux et aux animaux.

#### **2.3.2.2.5. Les hautes pressions**

Le principe des hautes pressions est d'appliquer un pressage isostatique à froid (pression identique dans toutes les directions de l'espace, en tout point de l'enceinte et donc du produit), d'une intensité de pression entre 4000 et 8000 bars en général. Ce traitement provoque la destruction des microorganismes en agissant sur les membranes et les parois cellulaires.

*L. monocytogenes* n'est pas une bactérie très résistante aux hautes pressions. Il faut cependant appliquer, aux fromages au lait de chèvre cru après 14 jours d'affinage, une pression de 400 MPa pendant 5 minutes (Gallot-Lavallée, 1998) pour réduire la population de 5,6 unités log lorsque *L. monocytogenes* a été inoculée à une concentration de  $10^7$  UFC/ml. De telles concentrations étant rares dans les fromages au lait cru, il serait judicieux d'étudier l'effet des hautes pressions sur des fromages dont les laits ont été inoculés avec des concentrations en *L. monocytogenes* plus faibles. De plus, en réduisant la flore totale du lait cru, en dénaturant plus ou moins réversiblement des protéines et en modifiant l'activité de nombreuses enzymes, les hautes pressions peuvent altérer les propriétés organoleptiques des fromages au lait cru.

#### **2.3.2.2.6. Les radiations ultraviolettes**

Lorsqu'un microorganisme est exposé à un rayonnement UV, la duplication de l'ADN est stoppée. Matak et al., (2005) ont testé l'efficacité de la lumière UV sur la réduction de *L. monocytogenes* inoculée dans du lait à une concentration de  $10^7$  UFC/ml. Une réduction supérieure à 5 log de la population de *L. monocytogenes* a été notée quand le lait a reçu une dose cumulée d'environ  $15,8 \text{ mJ/cm}^2$ . L'utilisation d'un tel traitement en technologie fromagère semble cependant difficile puisqu'il modifie les propriétés organoleptiques du lait.

#### **2.3.2.2.7. Le rayonnement ionisant**

L'ionisation est un principe physique qui consiste à bombarder un produit avec les rayons ou les électrons venant d'une source. La source peut-être constituée d'un radioélément qui émet des rayons gamma ou des rayons X. L'action létale des rayonnements ionisants est due à l'action sur la molécule





d'ADN : modification de l'ADN, perturbations des chaînes métaboliques, blocage de la multiplication cellulaire et mort de l'organisme.

En France, l'arrêté du 27 mars 1993 définit les conditions d'ionisation des Camemberts fabriqués au lait cru, à une dose comprise entre 2,25 et 3,5 kGy. Ce traitement doit permettre la diminution de la charge microbienne tout en conservant les qualités organoleptiques des produits (Le fromage, 1997). La radiosensibilité de *L. monocytogenes* a été étudiée en milieux de culture et dans différents aliments (Huhtanen et al., 1989 ; El Shenawy et al, 1989 ; Patterson et al., 1989 ; Farag et al., 1990). *Listeria sp.* s'est révélée relativement radiosensible. La dose de réduction décimale se situe, suivant la température et la nature de l'aliment irradié (rayons gamma), entre 0,25 et 0,77 kGy (Huhtanen et al., 1989 ; Monk et al., 1994).

Dans les fromages à pâte molle et croûte lavée, le traitement ionisant de leur surface, dans leur emballage commercial, a permis d'éliminer *L. monocytogenes* sans modification organoleptique majeure.

Ce type de traitement pourrait donc être réalisé en conditions industrielles.

#### **2.3.2.3. Les facteurs biotiques affectant la croissance et la survie de *L. monocytogenes* dans les laits et fromages (Figure 5)**

L'adjectif biotique qualifie ce qui est propre à la vie. Les facteurs biotiques sont un ensemble de facteurs écologiques liés aux êtres vivants. Dans les produits fermentés tels que le fromage, la communauté microbienne constitue la partie biotique de l'écosystème fromage.

Les interactions entre les microorganismes présents dans le fromage régissent la vie de la communauté microbienne du lait au fromage affiné. Les interactions se répartissent en deux groupes :

1 : les interactions positives (commensalisme, synergisme et mutualisme) qui caractérisent la stimulation d'un ou plusieurs microorganismes,

2 : les interactions négatives (compétition et antagonisme) qui correspondent à une inhibition de la croissance et des activités métaboliques (Choisy et al., 1997).

Le phénomène d'antagonisme est probablement l'interaction microbienne la plus étudiée dans les produits alimentaires car c'est un phénomène déterminant dans la maîtrise des pathogènes. Les effets antagonistes des composés antimicrobiens produits par les microorganismes naturellement présents dans les laits et produits laitiers contre les pathogènes ont été largement étudiés.

Afin de mieux contrôler la croissance de *L. monocytogenes* en lait et en fromages, il semble donc indispensable de connaître les microorganismes des laits et fromages et leur activité anti-listeria.



### **2.3.3. Microorganismes du fromage et leur activité antilisteria**

#### **2.3.3.1. Les bactéries lactiques**

##### **2.3.3.1.1. Caractéristiques**

Les bactéries lactiques sont présentes dans une grande variété d'aliments et sont à l'origine de transformations conditionnant la texture, la flaveur et les qualités de conservation des produits fermentés. Elles ont pour caractéristique commune la production d'acide lactique à partir de sucres.

L'étude de Cogan et al.(1997) sur 4379 isolats de 35 produits laitiers dont 10 fromages, révèle la diversité de la flore lactique avec 38% de *Lactococcus*, 17% d'*Enterococcus*, 14% de *Streptococcus thermophilus*, 12% de lactobacilles mésophiles, 10% de *Leuconostoc* et 9% de lactobacilles thermophiles.

Les principales espèces de lactocoques rencontrées dans les ferments mésophiles sont *Lactococcus lactis subsp. cremoris* et *Lc. lactis subsp. lactis*. *Lc. garvieae* a également été identifié dans des produits laitiers (Teixeira et al., 1996, Villani et al., 2001 ; El-Baradei et al., 2005). Bien que cette espèce ait été décrite comme pathogène pour différentes espèces de poissons (Kusuda et al., 1991 ; Avi Eldar et al., 1999 ; Vela et al., 2000), les infections humaines dues à *Lc. garvieae* sont rares ; seulement six cas ont été décrits et tous concernaient des personnes âgées ou des patients immunodéprimés (Fefer et al., 1998).

Les lactocoques ont pour principale fonction de transformer le lactose en acide lactique. Ils sont également impliqués dans la dégradation des protéines et peptides et dans le métabolisme des acides aminés du lait en composés aromatiques (Engels et al., 1996).

Les bactéries appartenant au genre *Enterococcus* sont des bactéries ubiquitaires, surtout rencontrées dans les sols, les fèces, le matériel et dans les aliments en particulier ceux d'origine animale comme les produits laitiers (Giraffa et al., 1997 ; Giraffa, 2003). Elles sont notamment présentes dans les laits crus. Le genre *Enterococcus* inclut plus de 20 espèces dont *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* qui sont les plus fréquemment isolées de produits laitiers (Gelsomino et al., 2001). Les entérocoques peuvent être utilisés dans certaines technologies fromagères en tant que ferment, par exemple dans la fabrication de la Mozzarella (Villani et Coppola, 1994). Certaines souches possèdent une activité acidifiante assez comparable à celle des lactocoques et elles contribuent de façon positive au développement de la flaveur pendant l'affinage des fromages. Leur innocuité est souvent questionnée car certaines espèces voire même certaines souches sont responsables d'infections nosocomiales et possèdent des facteurs de virulence (Elsner et al., 2000, Semedo et al., 2003).



Les lactobacilles mésophiles fréquemment isolés des fromages appartiennent aux espèces *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus curvatus*. Ces espèces ont la capacité unique de se développer dans des conditions hautement sélectives prévalant dans les fromages affinés. En effet, elles tolèrent un faible taux d'humidité dans le produit (61 à 68 % de matière sèche), 4 à 6 % de sel, des valeurs de pH comprises entre 4,9 et 5,3 et des températures inférieures à 13°C. Elles consomment des composés autres que le lactose comme le lactate, le citrate, le glycérol, les acides aminés et autres métabolites (Peterson et Marshall, 1990). Dans les fromages au lait cru, les espèces mésophiles de *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*) deviennent dominantes pendant l'affinage.

Les bactéries lactiques thermophiles essentiellement représentées par les espèces *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* en association avec *Streptococcus thermophilus* entrent dans la composition des levains thermophiles. Elles ont pour rôle essentiel de convertir le lactose en acide lactique de façon complète en moins de 24 heures.

Les espèces du genre *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*) sont surtout abondantes dans les fromages au lait cru. Ce sont des bactéries hétérofermentaires qui forment de l'éthanol, de l'acide acétique, du diacétyle et du D-lactate plutôt que du L-lactate. Les *Leuconostoc* participent également, par production de CO<sub>2</sub>, à l'ouverture des fromages à pâte persillée favorisant ainsi l'implantation de *Penicillium roquefortii*.

Les pédiocoques, dans les fromages de type Cheddar, ont d'abord été détectés par Dacre et al. en 1958. Ils ont également, entre autres, été isolés de la Féta (Vafopoulou-Mastrogiannaki et al., 1990), du Manura, fromage au lait de brebis (Gelsomino et al., 2001), de fromages fermiers d'Afrique du Sud (Gurira et al., 2005) et de fromages Salers (Callon et al., 2004). *Pediococcus acidilactici* est utilisé comme levain en complément d'autres ferments.

L'effet inhibiteur plus ou moins important qu'exercent les bactéries lactiques sur les flores pathogènes est principalement dû à la production de substances inhibitrices tels que les acides gras libres, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des peptides antimicrobiens. D'autre part, étant donnée leur grande tolérance aux bas pH extra et intracellulaires, les bactéries lactiques sont compétitives en condition acide.



#### **2.3.3.1.2. Le diacétyl**

Le diacétyl (2,3-butanedione) et ses formes réduites (acétoïne et 2,3-butanediol) sont produits par le métabolisme des sucres via le pyruvate (Molimard et Spinnler, 1996). Cependant, la production de diacétyl est faible à moins qu'il y ait une production de pyruvate, de citrate ou acétate. Plusieurs facteurs affectent la production de diacétyl par les streptocoques, les leuconostoc, les lactobacilles et les pédiocoques. La présence de lactate et une augmentation de la température de 21°C à 30°C réduisent la production de diacétyl. Au contraire, la production est augmentée avec la présence d'ions métalliques, en particulier  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ , par aération ou l'addition d'hydrogène et de catalase dans le lait. Le pH optimum pour la production de diacétyl se situe à pH 4,5-5,5. Ses propriétés antimicrobiennes diminuent avec une augmentation des valeurs de pH. Les bactéries lactiques ne sont pas affectées par des concentrations de diacétyl comprises entre 100 et 350 µg/ml lorsque les valeurs de pH se situent entre 5,0 et 7,0. Par contre, la majorité des bactéries à Gram positif non lactiques est inhibée par 300µg/ml à pH inférieur à 7,0. Les levures et les bactéries à Gram négatif le sont à 200µg/ml.

#### **2.3.3.1.3. Les acides gras et monoglycérides**

Les acides gras sont formés à partir des triglycérides par l'action des lipases, du métabolisme des hydrates de carbone ou de la dégradation des acides aminés. Les acides gras affectent la perméabilité membranaire, le transport de nutriments (Greenway et al., 1979) et l'activité enzymatique dans la membrane cellulaire (Voegas et Correia, 1991).

Les acides gras à moyenne chaîne carbonée (C6 à C14) possèdent une activité antagoniste vis-à-vis de *L. monocytogenes*. C'est un phénomène bien connu notamment pour l'acide laurique (C12:0) (Kinderlerer et al., 1996, Stecchini et al., 1996).

Dans du lait entier et dans du lait écrémé, l'acide linoléique K-conjugué est bactériostatique et prolonge la phase de latence de *L. monocytogenes* spécialement à 4°C (Wang et Johnsonn, 1992). La monolaurine inactive *L. monocytogenes* en lait écrémé à 4°C mais est moins efficace à 23°C. La monolaurine n'inhibe pas *L. monocytogenes* dans le lait entier en raison des fortes teneurs en gras. Les autres acides gras testés (acides laurique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique) n'ont été efficaces ni dans le lait entier, ni dans le lait écrémé.

Une concentration de 200 µg/cm<sup>2</sup> de monolaurine inhibe la croissance de *L. monocytogenes* à la surface dans un fromage de type Stracchino (Stecchini et al., 1996).





#### 2.3.3.1.4. Les acides organiques

Dans un habitat donné, les acides forts (HCl, acide phosphorique,...) sont sous forme dissociée et vont jouer un rôle uniquement sur le pH externe de la cellule, alors que les acides faibles, comme les acides organiques, seront sous la forme totalement ou partiellement dissociée ou sous la forme non dissociée selon le pH. En effet, les acides sont caractérisés par une valeur de pKa qui correspond au pH auquel il y a un équilibre entre les formes dissociées et non dissociées.

Les acides organiques volatils exercent un effet plus délétère sur *L. monocytogenes* que les acides inorganiques. Sous forme indissociée, les acides organiques étant lipophiles sont capables de traverser la membrane cytoplasmique des microorganismes et s'ils sont en forte concentration, agir directement sur le milieu intracellulaire en l'acidifiant à un point tel que les fonctions cellulaires peuvent être inhibées.

L'activité bactéricide ou bactériostatique des acides organiques varie avec l'acide. Ainsi, les travaux de Sorrells et al. (1989) ont notamment établi un classement en faisant varier la température et l'acide. A 10, 25 et 35°C, l'acide le plus inhibiteur est incontestablement l'acide acétique suivi de l'acide lactique, puis de l'acide citrique. Des observations similaires ont été faites par différents auteurs, dont Conner et al. (1990) et Vasseur et al. (1999). Pour expliquer ce classement, la plupart de ces auteurs s'accordent pour dire que l'effet observé provient du fait que les acides organiques sont à l'état non dissocié. L'acide para-aminobenzoïque est le plus inhibiteur des acides organiques (Larpent, 2000) vis-à-vis de *L. monocytogenes*. L'acide sorbique a un effet légèrement plus faible que celui du benzoate de sodium (El Shenawy et Marth, 1990).

Dans un fromage blanc produit avec des acides (acides citrique, malique et acétique), l'acide acétique (26,7% d'acide acétique non dissocié) s'est révélé significativement plus efficace que les acides malique (0,65% d'acide malique non dissocié) ou citrique (0,13% d'acide citrique non dissocié) pour contrôler la croissance de *L. monocytogenes* (Glass et al., 1995). *L. monocytogenes* est en plus faible concentration lorsque les teneurs en acide lactique produit par les bactéries lactiques sont les plus fortes (Hicks et Lund, 1991).

A la surface d'un fromage de type Stracchino, l'acide lactique à 1,4% est capable d'inhiber la croissance de *L. monocytogenes* (Stecchini et al., 1996).

En présence d'HCl (concentration en HCl non précisée), un petit nombre de *L. monocytogenes* (10 UFC/ml) est détecté dans le caillé pendant la préparation d'un fromage blanc alors qu'en présence d'acide gluconique (1,5%) *L. monocytogenes* ne survit pas (El Shenawy et Marth, 1990).



#### 2.3.4.1.5. Le pH

Le pH est un facteur physico-chimique dont les valeurs résultent de la production d'acides par les microorganismes et de la capacité tampon du milieu. C'est un des éléments sélectifs majeurs qui conditionnent la colonisation du fromage par les microorganismes utiles ou indésirables.

Les valeurs de pH auxquelles les microorganismes se développent ou survivent sont spécifiques à l'espèce voire à la souche. Généralement, les moisissures sont capables de croître à des valeurs de pH comprises entre 2,0 et 9,0, les levures entre 2,0 et 11,0 et les bactéries entre 4,5 et 9,0 (Beuvier, 2005).

Selon Shaack et Marth (1988), la baisse du pH du milieu à des valeurs de l'ordre de 4 en cours de processus de fermentation de laits écrémés, issue de l'acidification provoquée par les bactéries lactiques, serait responsable de l'inhibition de *L. monocytogenes*. Les auteurs précisent qu'en laits écrémés, l'effet des ferments thermophiles tels que *S. thermophilus* et/ou *Lactobacillus bulgaricus* est plus efficace que celui des mésophiles tels que *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Cependant, l'effet inhibiteur vis à vis de *L. monocytogenes* par les ferments lactiques est dépendant de la température à laquelle le lait est incubé mais également de la concentration des ferments inoculés.

Dans un caillé lactique espagnol, l'Afuega'l Pitu, fabriqué à partir de lait pasteurisé, *L. monocytogenes* a été inhibée par le ferment, constitué de 2 souches de *Lc. lactis* et d'une souche de *Ln. citreum*, responsable entre 5 et 7 jours de valeurs de pH avoisinant 4 (Margolles et al., 1997). Les auteurs suggèrent que de telles valeurs de pH sont proches de la limite de tolérance de *L. monocytogenes* et causeraient probablement des dommages cellulaires.

Cependant, dans un fromage traditionnel Grec, le Galotyri, *L. monocytogenes* ne se développe pas mais peut survivre pendant la conservation du fromage malgré les valeurs de pH inférieures à 4 (Rogga et al., 2005). Elle est également capable de survivre dans les fromages de type Feta à valeurs de pH inférieures à 4,30 (Papageorgiou and Marth, 1989). Elle peut se développer pendant la fabrication du Camembert alors que les valeurs de pH avoisinent 4,60 (Ryser et al., 1987).

*L. monocytogenes* est capable de répondre et de survivre aux bas pH de l'environnement en utilisant des mécanismes d'adaptation au stress comme l'induction de protéines. Comme face à la majorité des stress, la réponse de *L. monocytogenes* fait appel à la synthèse de protéines chaperonnes de réparation ou d'élimination des protéines non fonctionnelles. Par exemple, la protéine GroEL dont la synthèse est augmentée lors de la croissance de *L. monocytogenes* à basses températures est aussi induite en condition de stress acides. Les autres protéines induites peuvent être des ATP synthases et divers régulateurs transcriptionnels.

Une adaptation de *L. monocytogenes* pendant 2 heures à pH 5,2 augmente la résistance à un choc chaud (52°C), à un stress alcoolique et à un stress osmotique (25-30% NaCl) (Phan Than et al., 2000).

Espèce d'appartenance de la souche	Bactériocine	Fromage	Référence
<i>Enterococcus faecium</i>	N.I	Croute du Taleggio	Giraffa et al. 1997
<i>E. faecium</i>	N.I	lait de chèvre	Farias et al., 1999
<i>E. faecium</i>	Entéroccine	Manchego (pâte molle)	Nunez et al., 1999
<i>E. faecium</i>	Entéroccine	Manchego (pâte molle)	Garcia et al., 2004
<i>E. faecium</i>	N.I	Saint Paulin	Laukova et al., 2003
<i>E. faecium</i>	N.I	Cheddar	Foulquié-Moreno et al., 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pédiocine	fromage à pâte molle	Ennahar et al. 1998
<i>Lactococcus lactis</i>	Piscicoline	Camembert	Wan et al. 1997
<i>Lc. lactis</i>	Pédiocine	Cheddar	Buyong et al. 1998
<i>Lc. lactis</i>	Nisine	Wara fromage nigérian	Olasupo et al. 1999
<i>Lc. lactis</i>	lacticine	fromage blanc	McAuliffe et al., 1999
<i>Lc. lactis</i>	Nisine	fromage blanc	Benkerroum et al.2000
<i>Lc. lactis</i>	Pédiocine	cheese	Rodriguez et al. 2005
<i>Lc. lactis</i>	lacticine	surface de fromage	O Sullivan et al., 2005
<i>Lc. lactis lactis</i>	N.I	Jben fromage marocain	Benkerroum et al.2000
<i>Pediococcus sp</i>	N.I	fromage d'Afrique du sud	Guorira et al.2005
ferment	Nisine	Camembert (pâte molle)	Maisnier - Patin et al. 1992
ferment	Lacticine	Cottage cheese (pâte molle)	Mc Auliffe et al. 2004
-	Nisine	Type Ricotta (fromage frais lactique)	Davies et al. 1997
-	Entéroccine	Manchego (pâte molle)	Nunez et al. 1997
-	Nisine	Anthotyros	Samelis et al. 2002

**Tableau 2 : Bactéries productrices de bactériocines inhibitrices de *L. monocytogenes* en fromages**

NI : nom de la bactériocine non indiqué

- : nom de la bactérie productrice de la bactériocine non précisé

Les résistances croisées de *L. monocytogenes* (adaptation à un pH acide entraînant une résistance à un stress osmotique) permettent de mieux appréhender ses capacités d'adaptation en fromages.

#### **2.3.3.1.6. Le peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) inhibe la croissance, la respiration et la viabilité bactérienne. Il est toxique pour les espèces ne possédant pas de catalase. Son effet bactéricide est dû à l'oxydation causée directement ou indirectement par un métabolite comme le radical hydroxyle (OH), formé par la réaction entre l' $H_2O_2$  et des superoxydes (composés contenant le groupe  $O_2^-$ ). Le radical hydroxyle est très réactif et cause des dommages sur les composants cellulaires essentiels comme les lipides membranaires et l'ADN.

Un des exemples les plus connus d'inhibition de *L. monocytogenes* par le peroxyde d'hydrogène est le système lactoperoxydase-thiocyanate-peroxyde d'hydrogène (LPS). Comme le pH, le système LPS se situe à l'interface des facteurs biotiques et abiotiques.

La lactoperoxydase est une peroxydase naturelle présente dans le lait cru, qui en contient environ 10 à 30 mg/l. En présence de peroxyde d'hydrogène, la lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate principalement en produits qui ne seraient pas inhibiteurs, mais au cours de cette réaction principale des intermédiaires plus ou moins toxiques peuvent être produits comme l'ion hypothiocyanate ( $OSCN^-$ ) ou des oxyacides ( $O_2SCN^-$ ,  $O_3SCN^-$ ). D'autre part, ce système LPS entraîne des lésions dans la membrane des bactéries, causant des fuites d'ions potassium, d'acides aminés et de polypeptides cellulaires. De plus, des systèmes de transport des sucres et des acides aminés sont inhibés, ainsi que des synthèses d'ARN, d'ADN ou de protéines.

L'effet du système LPS sur la croissance de *L. monocytogenes* a été évalué dans plusieurs études. Boussouel et al. (2000) ont démontré un effet bactériostatique de 48 heures du système sur la croissance de *L. monocytogenes* dans un lait écrémé incubé à 25°C. Le système LPS retarde mais n'empêche pas la croissance de *L. monocytogenes* (Siragusa et Johnson, 1989). Par contre, Gay et Amgar (2005) en comparant la croissance de *L. monocytogenes* en Camembert et en lait pasteurisé, ne concluent pas clairement à un effet inhibiteur du système sur la croissance de *L. monocytogenes*.

#### **2.3.3.1.7. Les bactériocines (Tableau 2)**

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique à effet bactéricide dirigé contre les espèces généralement apparentées aux bactéries productrices (Klaenhammer, 1988). Elles se répartissent en quatre classes:



La classe I : les lantibiotiques, sont de petits peptides hydrophobes qui agissent au niveau de la membrane et contiennent des acides aminés non usuels comme les lantionines  $\beta$ -methyllantionine et des résidus comme dihydroalanine ou dihydrobutyrine. Le représentant de cette classe est la nisine.

La classe II : elle comprend une plus grande variété de structures, ce qui a nécessité la création de plusieurs sous groupes. Ce sont des petites bactériocines (PM inférieur à 10kDa) thermostables non modifiés.

La classe III : elle a été créée pour rassembler les bactériocines de taille supérieure à 10kDa. Elles sont thermolabiles (elles sont inactivées à 60°-100°C pendant 10 à 15 min).

La classe IV : Elle regroupe des bactériocines plus complexes et exigent des parties glucidiques ou lipidiques ou l'occurrence de deux peptides pour leur activité.

Toutes les bactériocines agissent de façon similaire en formant des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles, en provoquant des changements dans la perméabilité membranaire, ce qui diminue ou épuise la force proton-motrice (PMF) des cellules sensibles (Ennahar et al., 2000 ; Hechard et al., 2002).

La biopréservation utilisant des bactériocines ou des bactéries lactiques produisant des bactériocines peut être une barrière supplémentaire pour contrôler la croissance des bactéries pathogènes à Gram positif, comme *L. monocytogenes*, dans de nombreux fromages.

Ainsi, les bactériocines produites par *E. faecium* inhibent *L. monocytogenes* dans le fromage Saint-Paulin (Laukova et al., 2003), sur la croûte du fromage Taleggio (Giraffa et al., 1997), pendant la fabrication d'un fromage au lait de chèvre (Farias et al., 1999), dans le cheddar (Foulquié-Moreno et al., 2003). Des entérocinés (bactériocines de classe II) produites par des souches d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* ont montré un potentiel antilisteria dans le Manchego (Nunez et al., 1997, Garcia et al., 1997 ).

Dans un fromage à pâte molle, une pédiocine (bactériocine de classe II) produite par des souches de *Lb. plantarum* a également révélé une activité inhibitrice vis-à-vis de *L. monocytogenes* (Ennahar et al., 1998).

Buyong et al. (1998) et Rodriguez et al. (2005) ont montré l'efficacité de *Lc. lactis* productrice de pédiocine pour contrôler la croissance de *L. monocytogenes* en fromages. D'autres bactériocines comme la piscicoline (bactériocine de classe II) dans le Camembert (Wan et al., 1997), la lacticine (bactériocine de classe I) produites par *Lc. lactis* dans un fromage blanc (Mc Auliffe et al., 1999) et à la surface de fromages (O'Sullivan et al., 2006) ont également un potentiel inhibiteur de *L. monocytogenes*.





Certaines souches de *Lc. lactis* sont également capables de produire de la nisine (bactériocine de classe I). La nisine est la bactériocine la plus utilisée dans les produits alimentaires car seule l'application de la nisine A est légalement autorisée en France. Son utilisation n'est pas autorisée dans les produits carnés mais uniquement dans les produits dérivés de l'industrie laitière et dans certains desserts tels que les desserts à base de tapioca. La nisine est surtout active contre les bactéries à Gram positif. Le mécanisme d'action de la nisine implique principalement la formation de pores éphémères dans la membrane cytoplasmique de l'organisme cible avec une perte du potentiel membranaire et une fuite des métabolites intracellulaires résultants à la mort de la cellule.

Selon Benkerroum et Sandine (1988), l'action de la nisine est efficace sur du fromage blanc contaminé en *L. monocytogenes*. En effet, au bout de 24 heures à 37°C ou à 4°C, *L. monocytogenes* n'est pas détectable alors qu'elle avait été inoculée en début d'expérience à une concentration de  $3,5.10^5$  UFC/ml. Olasupo et al. (1999) ont également montré que la nisine produite par une souche de *Lc. lactis* était efficace dans le fromage nigérian, le Wara, pour inhiber *L. monocytogenes*.

L'utilisation de bactéries productrices de bactériocines avec un fort potentiel acidifiant est limitée et leur efficacité à long terme peut-être mise en doute au vu de l'apparition de souches pathogènes nisine et pédiocine-résistantes (Gravesen *et al.*, 2002). Selon Larpent (2000), *L. monocytogenes* devient résistante à la nisine quand celle-ci est en quantité trop élevée.

Il semble que des résistances croisées aux bactériocines peuvent apparaître rapidement (Song et Richard, 1997). D'autres travaux montrent au contraire qu'il n'y a pas de résistance croisée lorsque les bactériocines sont de classes différentes (Rasch et Knochel, 1998).

### **2.3.3.2. Les bactéries non lactiques**

#### **2.3.3.2.1. Caractéristiques**

Les bactéries non lactiques isolées de fromages appartiennent essentiellement aux groupes des staphylocoques et des bactéries corynéformes (Irlinger, 2000). Les bactéries appartenant à ces deux groupes ont des propriétés physiologiques qui leur permettent de se développer à la surface des fromages ; elles sont aérobies, alcalophiles, mésophiles, tolérantes aux fortes concentrations en sel et ne peuvent croître sous des conditions acides.

Les bactéries corynéformes comprennent les microorganismes du genre *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Microbacterium* (Irlinger et al., 2005).

Longtemps, *Brevibacterium linens* a été considéré comme l'espèce type, facile à identifier par sa pigmentation jaune orangée qui peut être responsable de la couleur de la surface des fromages. Cependant, elle ne représente que de 0 à 15% de la microflore de surface dans le Tilsit (Eliskases et



Ginzinger, 1995) et n'est jamais isolée du Gubbeen malgré son ensemencement en surface en début d'affinage (Brennan et al., 2002). Des souches précédemment assignées à *Brevi. linens* ont été assignées à l'espèce *Brevi. auriantacum*.

Le genre *Brachybacterium*, se distinguant du genre *Brevibacterium* dans lequel il était classé auparavant par des profils de lipides et de métaquinones différents (Schubert et al., 1993), est fortement représenté à la surface des fromages (Irlinger, 2000). Les espèces *Brachybacterium nesterenkovii*, *Brachybacterium faecium*, *Brachybacterium alimentarium*, *Brachybacterium tyrofermentans* ont été isolées respectivement de fromages Salers (Duthoit et al., 2003), de Livarot (Larpin et al., 2001), de Gruyère et de Beaufort (Schubert et al., 1996).

Des souches pigmentées en jaune appartenant aux espèces *Arthrobacter nicotianae* et *Arthrobacter globiformis* et deux espèces *Arthrobacter bergerei* et *Arthrobacter arilaitensis* plus récemment identifiées, ont été isolées de la surface de fromages (Valdès-Stauber et al., 1997 ; Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995 ; Irlinger et al., 2005). Le genre *Arthrobacter* peut être bien représenté au sein de la flore bactérienne superficielle car il est très répandu dans le sol et les environnements (Mulder, 1963). Les espèces *Arthrobacter nicotianae* et *Arthrobacter psychrolactophilus* ont été isolées de lait cru (Delbes et al., 2007).

Les corynébactéries sont des éléments majeurs de la surface des fromages affinés. Le genre *Corynebacterium* comprend de nombreuses espèces saprophytes. Dans les fromages Brick, le genre *Corynebacterium* est dominant (Valdès-Stauber et al., 1997) (près de 50 % des isolats). Les bactéries corynéformes ont un potentiel de production d'arômes particulièrement riche. Les espèces *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium ammonigenes*, *Corynebacterium insidiosum*, *Corynebacterium variabilis* (Brennan et al., 2001 ; Valdes-Stauber et al., 1997 et Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995) sont fréquemment isolées de surface de fromages. Des séquences correspondant aux ADNr 16S de *Coryne. afermentans*, *Coryne. variabilis* ainsi que *Coryne. flavescens* ont été identifiées dans le fromages Salers (Duthoit et al., 2003).

Les staphylocoques sont des bactéries anaérobies facultatives mais leur croissance est plus rapide dans des conditions aérobies. La plupart des souches se développent en présence de 15% de NaCl et à des températures comprises entre 18 et 40°C. Les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* ont été isolées d'une grande variété de fromages. Outre *Staphylococcus aureus* (présenté au paragraphe 2.1) à coagulase positive, les espèces les plus couramment rencontrées dans les fromages sont des staphylocoques à coagulase négative non pathogènes ou uniquement de façon opportuniste. Ils appartiennent aux espèces *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus vitunilus* et *Staphylococcus equorum* (Hoppe-Seyler et al., 2004 et Irlinger et al., 1997).



#### **2.3.3.2.2. Effet antagoniste vis-à-vis de *L. monocytogenes* des bactéries non lactiques**

La micrococcine, antibiotique macrocyclique, produite par une souche de *Staph equorum* s'est révélée inhibitrice de 130 sur 135 bactéries à Gram positif et des 95 souches de *Listeria* testées. Son potentiel antilisteria a également été démontré dans un fromage à pâte molle (Carnio et al., 2000).

En raison de contaminations de la surface de certains fromages par *L. monocytogenes*, l'effet antilisteria des bactéries corynéformes a été étudié. Seule une substance bactériolytique, la linenscine, produite par une souche de *Brevibacterium linens* a montré une activité antilisteria en fromage (Maisnier Patin et al., 1996). Cette substance n'est pas une bactériocine et sa structure n'a jamais été publiée.

#### **2.3.3.3. Les levures et moisissures**

##### **2.3.3.3.1. Caractéristiques**

Les levures présentes dans l'eau, l'air, le sol et les plantes peuvent se retrouver dans le lait et les fromages (Gueguen et Schmidt, 1992). Les concentrations en cellules viables de levures sont 100 à 1000 fois plus importantes sur la croûte qu'à cœur du fromage (Leclercq-perlat et al., 1999). Les levures sont dotées d'une activité protéolytique et aromatisante. Elles métabolisent le lactate, provoquant une augmentation des valeurs de pH, et peuvent sécréter des facteurs qui favorisent la croissance de *B. linens* dans les fromages Limburger et Tilsit (Fleet, 1990), et de *Penicillium roquefortii* dans les fromages à pâte persillée. Les levures peuvent également participer à l'ouverture de ces derniers par formation de gaz (Coghill et al., 1979). Les levures jouent un rôle essentiel dans la production d'arômes par la production d'une grande variété de composés volatils (Molimard et Spinnler, 1996). Dans le Camembert, les levures inhibent la croissance des moisissures indésirables.

Les levures les plus fréquemment rencontrées dans les fromages sont *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* (Besançon et al., 1992) ainsi que *Pichia sp.*, *Rhodotulora sp.*, *Trichosporon sp.*, *Candida sp.* et *Geotrichum sp.* (Beresford et Williams, 2004, Callon et al., 2005). Dans la flore superficielle du fromage Saint-Nectaire, la présence de cinq espèces principales, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sake*, *Candida intermedia* et *Candida sphaerica*, a été relevée (Dale et al., 1972), *Debaryo. hansenii* pouvant être considérée comme l'espèce dominante de la communauté microbienne naturelle du fromage St-Nectaire, aussi bien en surface qu'à l'intérieur de la pâte (Vergeade et al., 1976).



Certaines moisissures ont un intérêt technologique. Sur la croûte du Camembert et du Brie, *Penicillium camembertii* forme un feutrage blanc, et dans la pâte des « bleus » *Penicillium roquefortii* crée un aspect persillé. En fromage St-Nectaire, *Cylindrocarpon heteronema* est responsable du feutrage blanc ou rosé de la croûte (Ratomahenina et al., 1995).

Les flores fongiques, comprenant les genres *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Sporendonema*, *Epicoccum* et *Chrysosporium*, se développent à la surface des fromages français de type Tome de Savoie, Cantal et St-Nectaire alors que *Rhizocum* se multiplie sur la croûte des fromages italiens. Les moisissures contribuent à la neutralisation de la pâte en métabolisant l'acide lactique en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. La désacidification de la surface crée un gradient de pH de la surface vers l'intérieur.

#### **2.3.3.3.2. Effet antagoniste des levures et des moisissures**

Des souches de *Geotrichum candidum* inhibitrices de *L. monocytogenes* ont été isolées de produits laitiers. Dieuleveux et al. (1998) ont montré que deux composés produits par *G. candidum*, l'acide D-3 phényllactique et l'acide D-3 indolactique, agissaient activement dans l'inhibition. Les essais réalisés *in situ* sur des caillés de Saint Paulin avec utilisation de D-3 phényllactique purifié n'ont cependant montré qu'une inhibition modérée de *L. monocytogenes*. De la même manière, alors qu'en milieu synthétique, des souches de *G. candidum* semblent montrer un potentiel inhibiteur envers *L. monocytogenes*, cet effet n'est plus observé en modèle caillé Livarot (Larpin, 2006).

Une moindre contamination en *L. monocytogenes* de fromages à pâte persillée comparativement à des fromages à pâte molle à croûte fleurie a été expliquée par des concentrations en acides gras libres à moyenne chaîne carbonée plus importantes à la surface des Bleus d'Auvergne que dans le brie (Kinderlerer et al., 1996). Ce dernier contient moins de 0,1 g d'acide caproïque (C10:0) libre par kilogramme de fromage et uniquement des traces d'acides laurique (C12:0) et myristique (C14:0) libres alors que les teneurs s'élèvent respectivement à 0,4 à 1,2 g/kg, 1,8 à 2,5 g/kg et 2,5 à 6,4 g/kg dans les bleus analysés. Cette production résulte de la forte activité lipolytique de *P. roquefortii*.

#### **2.3.3.4. Les bactéries à Gram négatif**

##### **2.3.3.4.1. Caractéristiques**

Présentes dans les fromages au lait cru, les bactéries à Gram négatif peuvent devenir des flores d'altération lorsqu'elles sont en fortes proportions.

Les espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont les plus fréquemment rencontrées dans les fromages. Les espèces *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytica*,





*Stenotrophomonas maltophilia*, *Buttiauxella agrestis* ont été isolées des fromages Pont l'Evêque (Coiffier 1992), San Simon (Tornadijo et al., 2001) et Camembert (Ogier et al., 2002).

Les *Pseudomonas* et plus particulièrement *Pseudomonas fluorescens* peuvent être à l'origine de défauts de goût (amer putride) et d'aspect (viscosité de la croûte, tâche jaune).

#### **2.3.3.4.2. Effet commensaliste des bactéries à Gram négatif vis-à-vis de *L. monocytogenes***

Marshall et Schmidt (1991) ont élucidé les mécanismes physiologiques pouvant intervenir dans la stimulation de la croissance de *L. monocytogenes* par *Ps. fluorescens* en milieu lait. Ils ont ainsi montré une relation de commensalisme entre ces deux espèces. La protéolyse des caséines par *Ps. fluorescens* peut stimuler la croissance de *L. monocytogenes*.

#### **2.3.4. Combinaisons de facteurs biotiques et abiotiques pour inhiber *L. monocytogenes***

Arques et al. (2005) ont étudié l'effet d'un traitement haute pression combiné à des bactéries lactiques productrices de bactériocines sur la survie de *L. monocytogenes* dans un fromage au lait cru. Les auteurs ont montré que l'inhibition la plus forte était observée en présence de bactéries lactiques productrices de bactériocines et avec un traitement haute pression de 500 MPa.

Boussouel et al. (2000) et Zapico et al. (1998) ont montré que le système LPS et la nisine ajoutés ensemble dans le lait écrémé ont un effet synergique et bactéricide sur *L. monocytogenes*.

Dans un fromage espagnol, bien que les teneurs en sel et les valeurs d' $a_w$  ( $>0,943$ ) ne soient pas limitantes pour la croissance de *L. monocytogenes*, elles contribueraient avec les valeurs de pH avoisinant 4 à l'inactivation de *L. monocytogenes* (Margolles et al., 1997).

L'activité inhibitrice de deux consortia microbiens a été observée par Maoz et al (2003) sur la croûte de fromages bien qu'aucune substance inhibitrice n'ait été détectée pour les individus composant chaque consortium. Les inhibitions de *L. monocytogenes* par une communauté microbienne complexe dans la pâte de fromage Camembert (Gay and Amgar, 2005) et par *Lc. lactis* en lait pasteurisé (Pitt et al., 2000) ont été décrites sans que la cause ait été déterminée. Les inhibitions de *L. monocytogenes* ont été observées mais non expliquées.

L'analyse des interactions des communautés microbiennes complexes et la compréhension des mécanismes d'inhibition de *L. monocytogenes* en lait ou en fromage sont difficiles. Généralement, dans les communautés microbiennes de composition diverse, toutes les interactions possibles peuvent



se produire entre les différentes populations. Même si dans les communautés microbiennes de composition simples, le nombre d'interactions est plus restreint, les mécanismes d'interaction restent encore difficiles à élucider.

### **2.3.5. Modélisation de la croissance de *L. monocytogenes***

Le développement de méthodes de modélisation a pour objectif d'identifier des combinaisons de facteurs environnementaux qui permettraient ou préviendraient la croissance du microorganisme étudié. Les modèles développés tendent à prédire le comportement des microorganismes dans les aliments. Il est désormais possible de quantifier les paramètres constitutifs de modèle de croissance/non croissance de *L. monocytogenes*.

La compréhension des processus physiologiques qui ont lieu près de l'interface de croissance / non croissance et des changements induits par le passage d'un côté à l'autre de l'interface pourrait permettre l'utilisation de nouvelles techniques de conservation alimentaire, techniques qui auraient un impact minimum sur la qualité du produit (Mc Meekin et al., 2000).

Le Marc et al. (2002) ont modélisé la cinétique de croissance de *Listeria innocua* en fonction de valeurs de pH de 4,5 à 9,4, de teneurs en acides organiques comprises entre 16 et 64 mM et de 16 valeurs de température variant de 0,5 à 43°C. La température minimale théorique de croissance de *Listeria* a été estimée à -4,5°C et la valeur de pH minimale de 4,21. Les concentrations minimales inhibitrices des acides indissociés étaient de 8 mM pour l'acide lactique, 20,3 mM pour l'acide acétique et 8,8 mM pour l'acide propionique. A pH 5,3 et à une teneur en acides non dissociés de 14,2 mM, la croissance de *L. monocytogenes* était inhibée alors qu'à pH 4,54 et à une concentration en acides non dissociés de 9,8 mM, *L. monocytogenes* ne se multiplie pas. Ces observations tendent à confirmer l'effet interactif du pH et des acides non dissociés. Par cette étude, les auteurs confirment que l'addition d'acides faibles est importante dans les techniques de conservation des aliments et que la combinaison de faibles valeurs de pH, de fortes concentrations en acides faibles à basses températures sont capables d'inhiber le développement de *Listeria*.

Membre et al. (1997) ont étudié la croissance, la survie et la mort de *L. monocytogenes* dans un milieu synthétique. Une inactivation significative de *L. monocytogenes* a été obtenue avec 20 ppm de phénol et 4% (poids/volume) de NaCl à des températures comprises entre 4 et 12°C.

Augustin et Carlier (2000) ont modélisé la dynamique de croissance des populations de *L. monocytogenes* dans les aliments. Bien que la qualité descriptive globale du modèle soit satisfaisante, des limites à son utilisation sont apparues par rapport d'une part, à l'estimation des limites de croissance du microorganisme et d'autre part, à l'estimation du temps de latence. Une



amélioration du modèle a donc été proposée en prenant en compte les interactions entre les facteurs environnementaux tout en gardant une structure de modèle similaire.

Bolton et al. (1999) ont défini l'interface de croissance/non croissance de *L. monocytogenes* dans un fromage mexicain sur la base des concentrations en sel, les teneurs en eau et les valeurs de pH. Ils ont ainsi montré que la souche de *L. monocytogenes* étudiée ne se développait jamais lorsque les valeurs de pH variaient de 5 à 6 et les concentrations de la saumure de 8,17 à 16 %.

Les exemples de modélisation de croissance de *L. monocytogenes* sont donc nombreux mais cependant, il semblerait que l'adéquation entre la prévision et l'observation dans le produit étudié ne soit pas toujours bonne. Les facteurs abiotiques mais surtout biotiques telles que les interactions microbiennes qui interviennent lors de la fabrication de produits alimentaires fermentés comme le fromage sont généralement plus nombreuses et diverses que celles prises en compte lors des études de modélisation.



# **MATERIEL ET METHODES**





### **3. Matériel et Méthodes**

#### **3.1. Fabrication des fromages**

Tous les fromages ont été fabriqués selon une technologie de type Saint-Nectaire.

Dès son arrivée au laboratoire, le lait a été chauffé dans des cuves en inox à 32-33°C. Puis 2ml de présure (Beaugel 520-Ets Coquard, Villefranche sur Saône-France) ont été ajoutés dans les laits. Le décaillage, effectué 45 min après addition de la présure, a été suivi d'un brassage de 10 min assuré mécaniquement. Le caillé obtenu après soutirage du lactosérum a été pre-pressé. Il a ensuite été moulé et pressé pendant 24 h à 2,1 bar. La température de l'enceinte de pressage a été réduite de 24 à 18°C en 7 h jusqu'à ce que le pH atteigne 5,6. La surface des fromages a été salée avec 20g de sel au début du pressage. Après 1 jour, les fromages ont été démoulés et affinés en cave pendant 28 jours à 10°C avec 95% d'humidité relative.

#### **3.1.1. Fabrication de fromages au lait cru (cf. résultats chapitre 1)**

##### **3.1.1.1. Collecte du lait**

Les laits de 6 exploitations (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) ont été sélectionnés d'après les résultats obtenus dans une étude précédente (rapport DGAL, 2004). Ils ont été collectés dans chaque ferme juste après l'ensemencement du ferment habituellement utilisé. Les laits ont ensuite été transportés en conditions réfrigérées au laboratoire de l'INRA.

##### **3.1.1.2. Ensemencements**

##### **3.1.1.2.1. Sélection des souches de *L. monocytogenes***

Deux souches de *L. monocytogenes*, S1 et S2, ont été sélectionnées sur la base de leur origine et de leur profil génomique (Millet et al., 2006).

La souche S1, de ribotype DUP 1038, a été isolée d'un fromage Saint-Nectaire et la souche S2, de ribotype DUP 1039, de fèces de vache (Millet et al., 2002).



#### **3.1.1.2.2. Culture et conservation des souches de *L. monocytogenes***

Chacune des souches a été cultivée dans du lait écrémé reconstitué à 10%, incubé à 37°C pendant 24h, puis mélangée (v/v) à du lait reconstitué glycérolé (10%). Pour chacune des souches, un lot de 30 tubes contenant chacun 1,5 ml du mélange a été préparé et congelé à -80°C.

#### **3.1.1.2.3. Inoculation**

Les souches de *L. monocytogenes* ont été inoculées dans les laits à une concentration de 5 à 10 UFC/25 ml de lait.

En surface des fromages, les souches de *L. monocytogenes* ont été inoculées par badigeonnage après le démoulage, à une concentration de 5 à 10 UFC/25cm<sup>2</sup>.

Avant l'inoculation des souches de *L. monocytogenes*, tous les laits avaient été analysés afin de vérifier leur non contamination en *L. monocytogenes*.

#### **3.1.1.3. Fabrication**

Des petits fromages d'environ 400 g ont été fabriqués avec les laits crus de 6 exploitations fermières selon une technologie de type Saint-Nectaire. Ils ont été affinés en cave pendant 28 jours à 10°C avec 95% d'humidité relative.

Les fabrications ont été répétées 3 fois sur une période de 1 mois (pour chaque fabrication, 2 fromages ont été faits à partir du lait d'une même exploitation).

#### **3.1.1.4. Echantillonnage**

Des échantillons de fromages ont été prélevés à 1, 8, 18 et 28 jours. Ils ont été conservés au congélateur (-20°C) avant l'analyse des différents paramètres.

### **3.1.2. Fabrication de fromages au lait cru, au lait microfiltré, au lait microfiltré inoculé avec des communautés microbiennes de lait (cf. chapitre 2)**

#### **3.1.2.1. Traitement du lait**

Les laits des exploitations F3 et F5 ont été sélectionnés car le comportement de *L. monocytogenes* dans la pâte des fromages fabriqués à partir des laits de ces 2 exploitations était différent (résultats du chapitre 1). Les laits ont été collectés dans chaque ferme juste après la traite mais avant

```

graph TD
    LcF5[Lait cru F5] --> EcrF5[Ecrémage]
    LcF5 --> PasteF5[Pasteurisation 30' à 70°C]
    EcrF5 --> LcF5
    EcrF5 --> LEF5[Lait écrémé F5]
    LEF5 --> MF5[Microfiltration]
    MF5 --> RF5[Rétentat RF5]
    MF5 --> PF5[Perméat PF5]
    PasteF5 --> CrF5[Crème pasteurisée Cr F5]
    LcF3[Lait cru F3] --> EcrF3[Ecrémage]
    LcF3 --> PasteF3[Pasteurisation 30' à 70°C]
    EcrF3 --> LcF3
    EcrF3 --> LEF3[Lait écrémé F3]
    LEF3 --> MF3[Microfiltration]
    MF3 --> RF3[Rétentat RF3]
    MF3 --> PF3[Perméat PF3]
    PasteF3 --> CrF3[Crème pasteurisée Cr F3]
    RF5 --> Reconst[Reconstitution]
    PF5 --> Reconst
    CrF5 --> Reconst
    RF3 --> Reconst
    PF3 --> Reconst
    CrF3 --> Reconst
    Reconst --> LcF5
    Reconst --> LcF3
    Reconst --> PF5CrF5[PF5+CrF5]
    Reconst --> PF5RF5CrF5[PF5 + RF5 + CrF5]
    Reconst --> PF5RF3CrF5[PF5 + RF3 + CrF5]
    Reconst --> PF3RF5CrF3[PF3 + RF5 + CrF3]
    Reconst --> PF3RF3CrF3[PF3 + RF3 + CrF3]
    Reconst --> PF3CrF3[PF3+CrF3]
    subgraph Box [ ]
        direction TB
        MY800[+ MY 800]
        Lmono[+ 100 UFC/25 ml de L. monocytogenes]
    end
    LcF5 --> Box
    LcF3 --> Box
    style Box fill:none,stroke-dasharray: 5 5
    style Box width:100%,height:40px
    Box --> LcF5
    Box --> LcF3
    style LcF5 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style LcF3 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style PF5CrF5 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style PF5RF5CrF5 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style PF5RF3CrF5 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style PF3RF5CrF3 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style PF3RF3CrF3 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style PF3CrF3 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px
    style LcF5CrF3 fill:#fff,stroke:#000,stroke-width:1px

```

l'ensemencement en ferment. Ils ont ensuite été transportés dans les mêmes conditions que celles indiquées dans le paragraphe 3.1.1.1.

A l'arrivée au laboratoire, une partie du lait des deux fermes a été écrémée et microfiltrée. La microfiltration a été réalisée à l'aide d'un module de microfiltration MFS-1 (Alpha-Laval, Les Clayes-sous-Bois, France) équipé d'un cartouche de porosité de 0,8µm. Le débit de l'appareil était de 100 litres /heure. La crème a été pasteurisée dans un bain-marie à 65°C pendant 45 minutes, puis refroidie à 4°C.

### **3.1.2.2. Ensemencement**

La souche S1 de *L. monocytogenes* a été inoculée dans les laits à une concentration de 50 à 100 UFC/25 ml de lait juste avant ensemencement en ferments et emprésurage. Elle avait été cultivée et conservée comme indiqué dans le paragraphe 3.1.1.2.2.

Tous les laits ont également été ensemencés avec un ferment commercial MY800 (Texel, Rhône-Poulenc, Dangé Saint Romain, France) à une concentration de  $10^7$  UFC/ml.

### **3.1.2.3. Fabrication**

Le protocole expérimental de fabrication des fromages est présenté dans la Figure 6.

Les différents fromages obtenus sont :

- des fromages fabriqués avec les laits crus F5 et F3,
- des fromages fabriqués avec les laits microfiltrés notés PF5 lorsque le perméat (lait microfiltré) a été obtenu à partir du lait cru F5 et PF3 lorsque le perméat a été obtenu du lait cru F3,
- des fromages fabriqués avec du lait microfiltré combiné à un rétentat de même origine. Les fromages ont été notés PF5+RF5 lorsque le perméat (P) et le rétentat France ont pour origine l'exploitation F5 et PF3 +R F3 quand le perméat (P) et le rétentat France ont pour origine l'exploitation F3
- des fromages fabriqués avec du lait microfiltré combiné à un rétentat d'origine différente. Les fromages ont été nommés PF5 +RF3 lorsque le perméat a été obtenu à partir du lait cru F5 et le rétentat à partir du lait cru F3 et notés PF3+RF5 lorsque le perméat a été obtenu à partir du lait cru F3 et le rétentat à partir du lait cru F5.

Ils ont été affinés en cave pendant 28 jours à 10°C avec 95% d'humidité relative.

Chaque fabrication a été répétée deux fois (2 fromages sont fabriqués à partir du lait d'une même exploitation sur une période d'un mois).



#### **3.1.2.4. Echantillonnage**

Les échantillons de fromages ont été prélevés à 1, 8, 18 et 28 jours. Ils ont été conservés au congélateur (-20°C) avant l'analyse des différents paramètres.

### **3.1.3. Fabrication de fromages au lait cru et au lait pasteurisé**

#### **3.1.3.1. Traitement du lait**

Le lait de l'exploitation F5 a été collecté à la ferme juste après la traite mais avant l'ensemencement en ferment. Il a ensuite été transporté dans les mêmes conditions que celles indiquées dans le paragraphe 3.1.1.1.

A l'arrivée au laboratoire, une partie du lait a été pasteurisée (pasteurisateur Pieralisi série PC15-2, Jesy-France) pendant 30 sec à 72°C alors que l'autre partie du lait cru a été maintenue à 4°C

#### **3.1.3.2. Ensemencements**

La souche S1 de *L. monocytogenes* a été inoculée dans les laits à une concentration de 5 à 10 UFC/25 ml de lait juste avant ensemencement en ferment et emprésurage. La souche de *L. monocytogenes* a été cultivée et conservée comme indiqué dans le paragraphe 3.1.1.2.2.

Tous les laits ont également étéensemencés avec une souche de *S. thermophilus* MY8001a isolée d'un ferment commercial MY800 à une concentration de  $10^7$  UFC/ml.

La souche de *S. thermophilus* a été cultivée dans un bouillon M17 incubé à 42°C pendant 2 jours. Les cultures ont ensuite été centrifugées 15 min à 5000 rpm à 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). Les culots ont été repris dans du lait glycérolé (15%) auquel a été additionné de l'ascorbate (0,4%). Un lot de 20 tubes contenant chacun 1,5 ml de suspension microbienne a été préparé et congelé à -80°C.

#### **3.1.3.3. Fabrication**

Les différents fromages obtenus sont :

- des fromages fabriqués avec les laits crus F5,
- des fromages au lait pasteurisé.

Ils ont été affinés en cave pendant 28 jours à 10°C avec 95% d'humidité relative.

Chaque fabrication a été répétée deux fois (2 fromages sont fabriqués à partir du lait d'une même exploitation sur une période d'un mois).





### **3.1.3.4. Echantillonnage**

Les échantillons de fromages ont été prélevés à 1, 8, 18 et 28 jours. Ils ont été conservés au congélateur (-20°C) avant l'analyse des différents paramètres.

## **3.1.4. Fabrication de fromages au lait pasteurisé inoculé avec différentes souches bactériennes (chapitre 3)**

### **3.1.4.1. Traitement du lait**

Le lait a été collecté à la ferme de l'Ecole Nationale des Industries du Lait et de la Viande (ENILV) d'Aurillac juste après la traite et avant ensemencement en ferment et transporté en moins de 10 minutes au laboratoire.

Le lait a été pasteurisé (pasteurisateur Peralisi série PC15-2, Jesy-France) pendant 30 sec à 72°C.

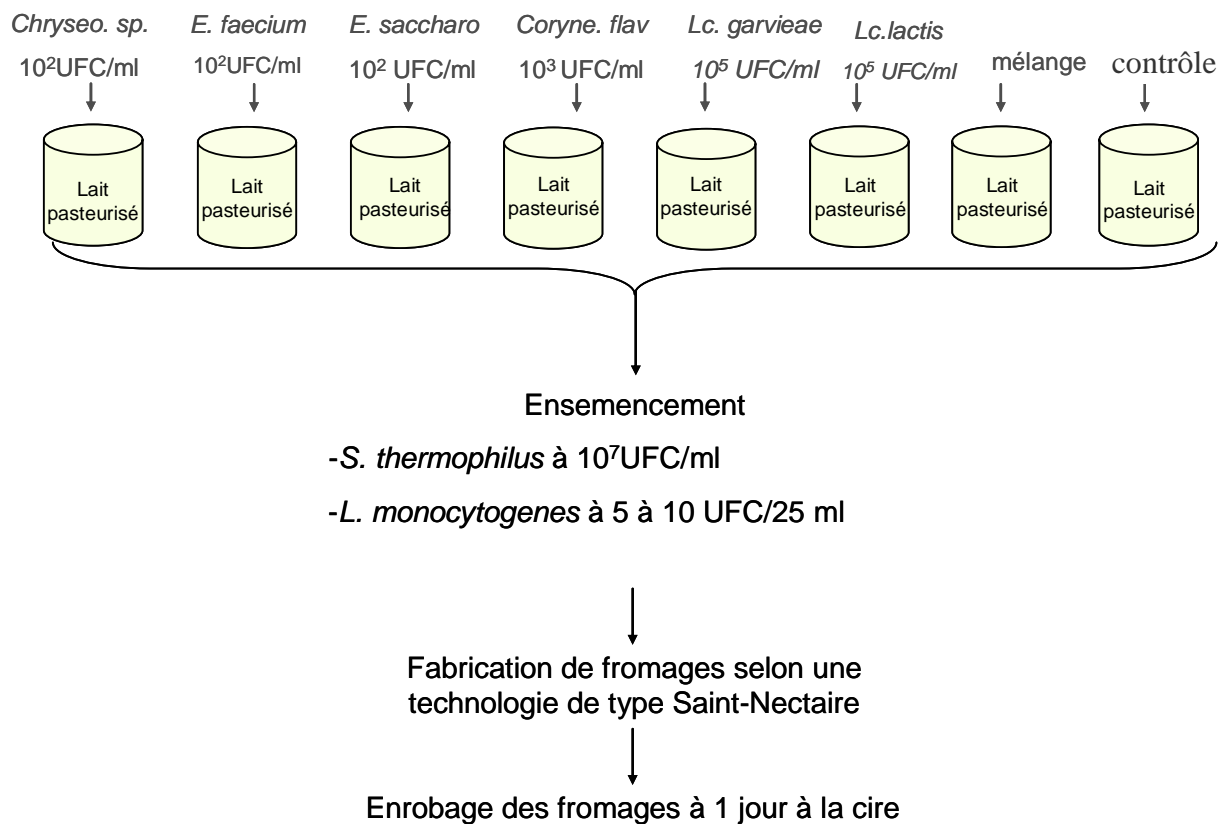
### **3.1.4.2. Ensemencements**

Tous les laits ont été inoculés avec la souche S1 de *L. monocytogenes* à une concentration de 5 à 10 UFC/25 ml de lait et avec une souche de *S. thermophilus* à une concentration de  $10^7$  UFC/ml. Les conditions de culture et de conservation de *L. monocytogenes* sont indiquées dans le paragraphe 3.1.1.2.2 et celles de *S. thermophilus* dans le paragraphe 3.1.3.2.

D'autres espèces bactériennes ont également été ensemencées dans les laits pasteurisés comme indiqué dans la figure 7, aux concentrations suivantes : *Chryseobacterium spp.*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus saccharominimus* ont été inoculés à  $10^2$  UFC/ml, *Corynebacterium flavescens*. A  $10^3$  UFC/ml, *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* à  $10^5$  UFC/ml. Le niveau d'inoculation a été choisi en fonction des résultats des dénombrements bactériens du lait cru F5. Un lait a été uniquement inoculé avec *S. thermophilus*.

Les souches de *Chryseobacterium spp.*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus saccharominimus* *Corynebacterium flavescens*, *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* ont été isolées du rétentat F5. Les souches ont été cultivées dans un bouillon de culture approprié, incubées à une température et pendant un temps favorisant leur croissance (Annexe 1). Les cultures ont ensuite été centrifugées 15 min à 5000 rpm à 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). Les culots ont été repris dans du lait glycérolé (15%) auquel a été additionné de l'ascorbate (0,4%) sauf pour la souche de *Chryseobacterium spp.* (Annexe 1).

Pour chacune des souches, un lot de 20 tubes contenant chacun 1,5 ml de suspension microbienne a été préparé et congelé à -80°C.



**Figure 7: Protocole expérimental de fabrication de fromages dont les laits ont été inoculés avec différentes souches bactériennes et *L. monocytogenes***

Témoin : fromage dont le lait a été inoculé uniquement avec *Streptococcus thermophilus* et *Listeria monocytogenes*

*Chryseo* : *Chryseobacterium*, *sp* : *species*, *E* : *Enterococcus*, *saccharo* : *saccharominimus*, *Coryne*: *Corynebacterium*, *flav.*: *flavescens*, *Lc*:*Lactococcus*. ; Mélange : mélange des 6 souches bactériennes

*S. thermophilus* : souche de *Streptococcus thermophilus* isolé d'un ferment acidifiant, utilisé comme ferment dans cette expérimentation

*L. monocytogenes* : souche S1 de *Listeria monocytogenes*

Les fromages ont été enrobés en sortie de presse avec de la cire orange contenant de la natamycine (1000 ppm) afin de prévenir la contamination des croûtes par les moisissures

Tous les laits ont étéensemencés à partir d'un tube décongelé (Annexe 1) et dilué immédiatement avant son utilisation.

#### **3.1.4.3. Fabrication**

Le protocole expérimental de fabrication des différents types de fromages est présenté dans la figure 7. Les fromages ont été fabriqués selon une technologie de type Saint-Nectaire. A 1 jour, tous les fromages ont été enrobés à la cire orange contenant 1000 ppm de natamycine (Coquard, Villefranche sur Saône, France) afin d'éviter le développement des moisissures sur la croûte.

Ils ont été affinés en cave pendant 28 jours à 10°C et 95% d'humidité relative. Chaque fabrication a été répétée deux fois.

#### **3.1.4.4. Echantillonnage**

Les échantillons de fromages ont été prélevés à 1, 8, 18 et 28 jours. Ils ont été conservés au congélateur (-20°C) avant l'analyse des différents paramètres.

### **3.1.5. Fabrications de fromages au lait pasteurisé inoculé avec des communautés microbiennes reconstituées plus ou moins complexes (cf. chapitre 4)**

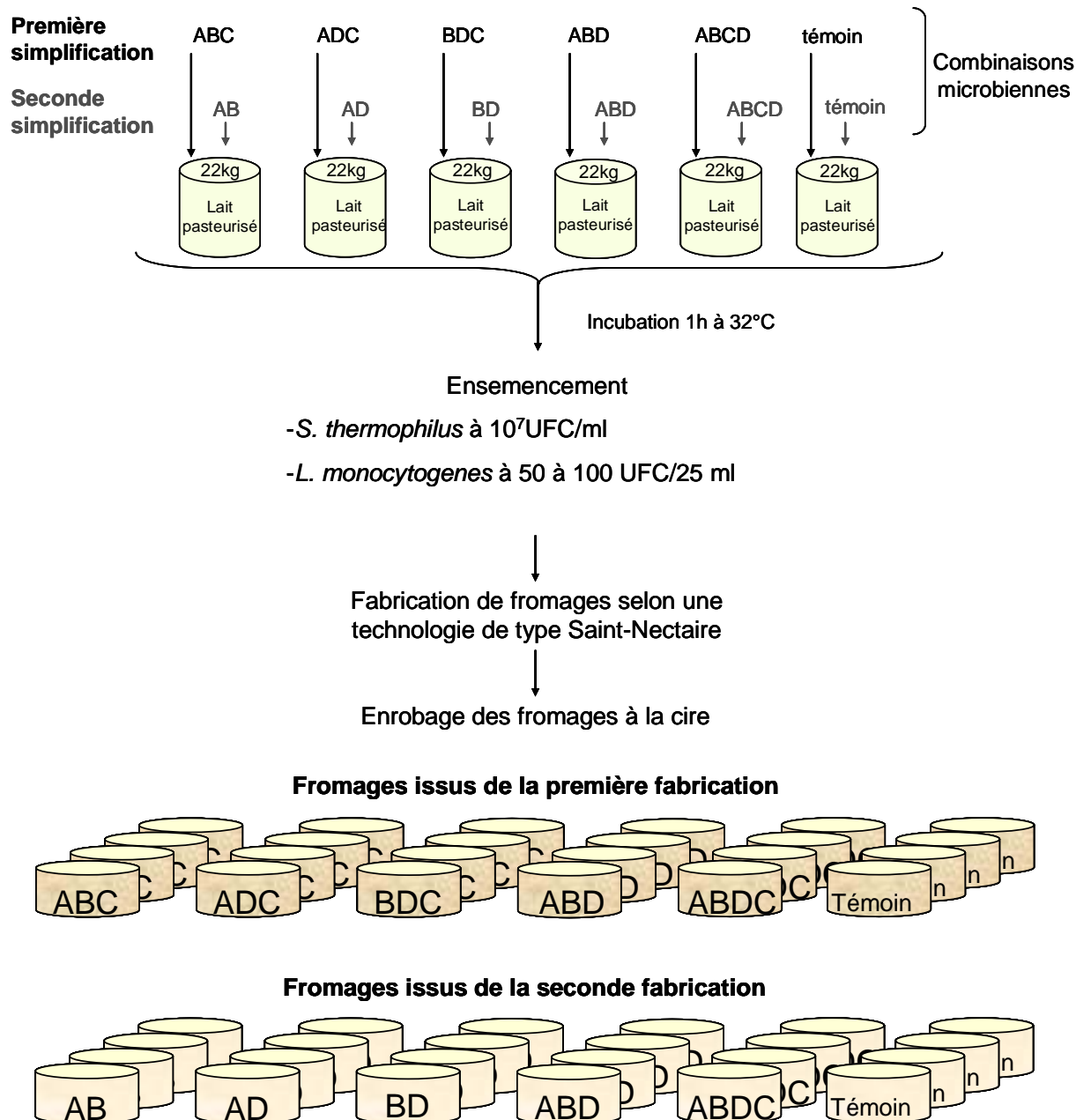
#### **3.1.5.1. Traitement du lait**

Le lait a été collecté à l'ENILV d'Aurillac avant ensemencement en ferment puis transporté immédiatement à l'INRA d'Aurillac où il a été pasteurisé (pasteurisateur Pieralisi série PC15-2, Jesy-France) pendant 30 sec à 72°C dès son arrivée. Le lait pasteurisé a été réparti dans 6 cuves et réchauffé à 32°C.

#### **3.1.5.2. Ensemencements**

##### **3.1.5.2.1. Conservation des souches**

Les 32 souches sélectionnées pour reconstituer les communautés microbiennes, ont été cultivées dans un bouillon de culture approprié, incubées à une température et pendant un temps favorisant leur croissance (Annexe 1). Les cultures ont ensuite été centrifugées 15 min à 5000 rpm à 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). Les culots de chaque souche ont été repris dans du lait glycérolé (15%) auquel a été additionné de l'ascorbate (0,4%) pour les culots



**Figure 8 : Protocole expérimental de fabrication de fromages dont les laits ont été inoculés avec les différentes combinaisons microbiennes et *L. monocytogenes***

ABC, ABD, ADC, BDC, ABCD, AB, AD, BD : fromages dont les laits ont été inoculés avec les combinaisons microbiennes plus ou moins complexes

A : bactéries lactiques ; B : bactéries non lactiques à Gram positif ; C : bactéries à gram négatif ; D : levures constituant le groupe D

Témoin : fromage dont le lait a été inoculé uniquement avec *Streptococcus thermophilus* et *Listeria monocytogenes*

*S. thermophilus* : souche de *Streptococcus thermophilus* isolé d'un ferment acidifiant, utilisé comme ferment dans cette expérimentation

*L. monocytogenes* : souche S1 de *Listeria monocytogenes*

Les fromages ont été enrobés en sortie de presse avec de la cire orange contenant de la natamycine (1000 ppm) afin de prévenir la contamination des croûtes par les moisissures

des bactéries à Gram positif. Pour chacune des souches, un lot de 20 tubes contenant chacun 1,5 ml de suspension microbienne a été préparé et congelé à – 80°C.

Les souches de *S. thermophilus* MY8001a, de *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* ont été cultivées dans un bouillon M17 incubé à 42°C pour la souche de *S. thermophilus* et à 30°C pour les 2 souches de Lactocoques, conservées et décongelées dans les mêmes conditions que les souches bactériennes constitutives du groupe A des bactéries lactiques.

La souche de *L. monocytogenes* a été conservée comme décrit dans le paragraphe 3.1.1.2.2.

Tous les laits ont étéensemencés à partir d'un tube décongelé (Annexe 1) et dilué immédiatement avant son utilisation.

### **3.1.5.2.2. Inoculation des combinaisons microbiennes**

Comme indiqué sur la figure 8, les laits de chaque cuve ont étéensemencés avec une combinaison microbienne différente associant le groupe des bactéries lactiques ou groupe A, le groupe des bactéries non lactiques à Gram positif ou groupe B, le groupe des bactéries à Gram négatif ou groupe C et le groupe des levures ou groupe D. Les laits ont ainsi été inoculés :

- lors de la première série de fabrications, avec les cocktails microbiens ABCD, ABD, ABC, BDC et ADC
- lors de la seconde série de fabrications, avec les combinaisons microbiennes ABCD, ABD, AB, AD et BD

Pour chaque fabrication, des fromages contrôles ont été fabriqués avec du laitensemencé uniquement avec *S. thermophilus* et *L. monocytogenes*.

Les niveaux d'inoculation des différentes souches sont indiqués dans le tableau 3.

### **3.1.5.2.3. Inoculation de *S. thermophilus* et *L. monocytogenes***

Après 1h d'incubation à 32°C, les laits de chaque cuve ont été inoculés par une souche de *S. thermophilus* isolé d'un ferment commercial acidifiant, à une concentration de  $10^7$  UFC/ml et simultanément, avec une souche de *L. monocytogenes* S1 à une concentration de 50 à 100 UFC/25ml mise en conservation dans les mêmes conditions que celles indiquées dans le paragraphe 3.1.1.2.2.

### **3.1.5.3. Fabrication**

Après avoirensemencé les différentes combinaisons microbiennes, le ferment (*S. thermophilus*) et *L. monocytogenes*, des fromages d'environ 450g, soit 4 fromages par cuve, ont été fabriqués selon la technologie de type Saint-Nectaire et affinés 28 jours. Les fromages ont été enrobés à 1 et 8 jours avec

espèces sélectionnées	niveau d'inoculum (log UFC/ml)	groupe taxonomique
<i>Lactobacillus casei</i>	2,99	<b>A</b> <b>Bactéries</b> <b>lactiques</b>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,98	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3,03	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,88	
<i>Lactobacillus farciminis</i>	2,98	
<i>Leuconostoc citreum</i>	3,31	
<i>Ln pseudomesenteroides</i>	3,30	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,93	
<i>Enterococcus hirae</i>	2,01	<b>B</b> <b>Bactéries non</b> <b>lactiques à</b> <b>Gram positif</b>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2,14	
<i>Staphylococcus equorum</i>	2,36	
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	3,07	
<i>Microbacterium</i> sp.	3,25	
<i>Corynebacterium flavesens</i>	1,93	
<i>Corynebacterium casei</i>	2,04	
<i>Brevibacterium linens</i>	1,96	
<i>Exiguobacterium</i> sp.	3,22	
<i>Kocuria rhizophilia</i>	3,18	
<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	2,09	<b>C</b> <b>Bactéries à</b> <b>Gram négatif</b>
<i>Rothia</i> sp.	1,95	
<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	2,21	
<i>Pseudomonas putida</i>	1,92	
<i>Enterobacter amnigenus</i>	3,81	
<i>Comamonas testosteroni</i>	3,07	
<i>Acinetobacter</i> sp.	2,09	
<i>Chryseobacterium</i> sp.	2,08	<b>D</b> <b>Levures</b>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,12	
<i>Rhodosp. Babjevae</i>	1,82	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1,83	
<i>Candida pseudointermedia</i>	1,69	
<i>Candida pararugosa</i>	1,79	
<i>Candida deformans</i>	1,83	

**Tableau 3 : Niveaux d'inoculation des 32 espèces microbiennes sélectionnées pour reconstituer les communautés microbiennes**

de la cire orange contenant de la natamycine (1000 ppm) (Plasti-enrob, Coquard, Villefranche sur Saône) afin d'éviter le développement des moisissures sur la croûte.

#### **3.1.5.4. Echantillonnage**

Les échantillons de fromages de la première fabrication ont été prélevés à 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22 et 28 jours et ceux de la seconde fabrication à 1, 6, 8, 13, 15, 18, 20, 22, 25 et 28 jours à 10°C avec 95% d'humidité relative. Ils ont été conservés au congélateur (-20°C) avant l'analyse des différents paramètres. Seules les mesures de pH et d'extrait sec ont été réalisées immédiatement après le prélèvement des échantillons.

### **3.2. Analyse des populations microbiennes**

#### **3.2.1. Choix des méthodes**

Afin d'analyser les populations microbiennes des différents fromages deux approches ont été utilisées, une approche de microbiologie classique (dénombrement) et une approche moléculaire directe. La structure de la communauté cultivable sur un milieu a été appréciée par application de la méthode Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Cette méthode a été aussi appliquée directement à partir du pool d'acides nucléiques des fromages pour avoir une autre vision de la dynamique des populations bactériennes en s'affranchissant de la culture d'isolats. Elle a été préférée aux autres méthodes moléculaires (TGGE, DGGE) en raison de l'expérience du laboratoire avec cette technique qui avait montré sa pertinence pour suivre la dynamique des populations bactériennes du fromage Salers (Duthoit et al., 2003).

#### **3.2.2. Microbiologie classique**

##### **3.2.2.1. Dénombrement des microorganismes**

Dix grammes de fromages ont été homogénéisés pendant 2 min dans 50 ml de tampon phosphate (Gomri, 1946) à l'aide d'un stomacher (MIX 1, AES Laboratoire, Combourg – France). Les microorganismes ont été dénombrés sur différents milieux de dénombrements (Tableau 4).

*L. monocytogenes* a été dénombrée selon la norme ISO 11200 par le Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières (LIAL) d'Aurillac.



Milieu	incubation		cible présumée	Références
	Temps (jours)	Température (°C)		
Milieu 17 (M17)	3	30	Microorganismes mésophiles	Terzaghi <i>et al.</i> , 1975
Milieu 17	2	42	Microorganismes thermophiles	Terzaghi <i>et al.</i> , 1975
Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF)	1	37	<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase + et bactéries d'affinage	De buyser <i>et al.</i> , 2003
Slanetz Bartley (SB)	2	42	Entérocoques	Slanetz <i>et al.</i> , 1957
Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)	3 à 4	25	Levures et moisissures	FIL-IDF 94B, 1991
Facultatively Heterofermentative (FH)	3	30	Lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs	Isolini <i>et al.</i> , 1990
Turner + acide nalidixique (T+a.n.)	3	30	Lactocoques	Turner <i>et al.</i> , 1963
PCA+L+inhibiteur de bactéries à Gram+ (PCA+L+I)	3	30	Bactéries à Gram négatif	FIL-IDF 100B, 1991
Mayeux Sandine Elikor (MSE)	3	30	<i>Leuconostoc</i>	Mayeux <i>et al.</i> , 1962
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	5 et 10	25	Bactéries d'affinage	Denis <i>et al.</i> , 2001
Violet red Bile Glucose (VRBG) agar	1	42	Entérobactéries	NFV 08-021, 1985

**Tableau 4 : Conditions de dénombrement : milieux, temps et températures d’incubation**

T°C : Température en degrés Celsius  
 Bactéries à Gram - : bactéries à Gram négatif  
*spp* : *species*  
 Le milieu FH a été incubé en conditions d’anaérobiose

Les résultats des dénombrements microbiens ont été exprimés en Unité Formant Colonie (UFC) par millilitre de lait et par gramme de pâte de fromage. Les valeurs ont ensuite été converties en logarithme décimal.

### **3.2.2.2. Identification des isolats de la communauté microbienne inhibitrice de *L. monocytogenes* en fromage**

Les microorganismes du rétentat F5 ont été dénombrés sur 15 milieux gélosés. Une collection de 166 isolats issus de ces différents milieux a été constituée par prélèvement sur chacun des milieux de dénombrement de 10 à 12 colonies morphologiquement différentes.

Les colonies prélevées ont été isolées sur milieu gélosé. Après incubation, une colonie a été repiquée sur bouillon (Annexe 2). Les températures et temps d'incubation sont ceux du milieu d'origine. Puis, 0,2ml de culture ont été mélangés à 1,8 ml de lait écrémé reconstitué à 10% et glycérolé (10%). Le mélange a été congelé à -80°C.

Les isolats issus de ces différents milieux ont été identifiés par le séquençage d'environ 300 pb de l'extrémité 5' de l'ADN ribosomal 16S pour les bactéries et de l'ADN ribosomal 26S pour les levures (Callon et al., 2006).

Chaque séquence a été comparée aux séquences de la base de données du NCBI en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Seules les similarités supérieures à 98% avec les séquences de la base de données ont été prises en compte.

### **3.2.2.3. Capacités inhibitrices des isolats microbiens**

Les capacités inhibitrices vis-à-vis de *L. monocytogenes* des isolats microbiens ont été testés suivant la méthode directe de Tagg et McGiven (1971) modifiée par l'utilisation d'une double couche de milieux gélosés.

Un bouillon favorisant la croissance de la souche a été inoculé par la souche à tester puis incubée dans les conditions appropriées. La culture obtenue a été centrifugée à 5000g pendant 10min à 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). Le surnageant a été ajusté à une valeur de pH de 6 avec de la soude 1M, puis filtré grâce à un filtre d'ester mixte de cellulose de 0.45µm (Minisart Sartorius, Hannover, France). Le filtrat obtenu constitue l'extrait de culture.

Parallèlement des boîtes de Pétri en double couche ont été préparées de la façon suivante : une couche de gélose (20ml) favorisant la croissance de la souche à tester a été recouverte de 10 ml de gélose Tryptone Soy-Yeast Extract (0,6% d'extrait de levure)ensemencée d'une culture de 18 h de *L. monocytogenes* (la gélose TS-YE fondue est refroidie à 45°C, puisensemencée d'une culture de *L. monocytogenes* de 18h dans un bouillon TS-YE à 37°C). Après solidification, des puits ont été creusés

Amorces	Séquence	conditions d' amplification	Cible	Références
w02	GNTACCTTGTTACGACTT	5 min at 96°C		Godon et al., 1997
w18	GAGTTTGATCTMTGGCTCAG	25 cycles of: 60 s at 96°C; 30 s at 50°C; 60 s at 72°C 10 min at 72°C	SSU ARNr bactérie	Godon et al., 1997
w34	TTACCGCGGCGTGCTGGCAC	3 min at 96°C		Zumstein et al., 2000
w49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	30 cycles of: 30 s at 96°C; 30 s at 61°C; 30 s at 72°C 10 min at 72°C	SSU ARNr bactérie	Delbes et al., 1998
V2F	GGCGAACGGGTGAGTAA	3 min at 96°C		Duthoit et al., 2003
V2R	ACTGCTGCCTCCCGTAG	30 cycles of: 30 s at 96°C; 30 s at 55°C; 45 s at 72°C 10 min at 72°C	SSU ARNr bactérie	Duthoit et al., 2003
Gram 1F	CCTAATACATGCAAGTCG	3 min at 96°C		
Gram 2R	CTCAGTCCCAATGTGGCC	30 cycles of: 30 s at 96°C; 30 s at 52°C; 45 s at 72°C 10min	SSU ARNr bactérie	cette étude

**Tableau 5 : Amorces PCR utilisées dans cette étude**

SSU : small subunit : petite sous unité

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

dans la gélose à travers la couche supérieure à l'aide d'un tube stérile. Les boîtes ont été ensuite séchées pendant 10 min à 55°C, puis les puits ont été remplis d'extrait de culture (environ 100µl).

Après diffusion des extraits de culture dans la gélose, les boîtes ont été incubées pendant 18h à 37°C, puis examinées pour la présence de zones d'inhibition autour des puits.

L'activité antibactérienne a été estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition observée autour des puits, c'est-à-dire le double de la distance en mm, allant du bord du puit jusqu'au point où se termine l'inhibition.

L'inhibition de la souche indicatrice *Micrococcus luteus* CIP A270 sensible à la nisine, par la souche test *Lc. lactis* ATCC 11451 productrice de nisine, a été utilisée comme témoin de la méthode.

### **3.2.3. Préparation des acides nucléiques avant analyse par Single Strand Conformation Polymorphism**

#### **3.2.3.1. Extraction d'ADN**

L'ADN total a été extrait directement des fromages selon la méthode au phénol chloroforme décrite par Duthoit et al. (2003).

#### **3.2.3.2. Amplification d'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Les amplifications PCR ont été réalisées à partir des ADN extraits des échantillons de fromages.

L'ADN total a été amplifié dans 25 µl de mélange réactionnel contenant : 10 µM de chacune des amorces oligonucéotidiques, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), 1,25 unités de PfuUltra™ High-Fidelity polymérase (Stratagene Europe, Amsterdam Zuidooost, Hollande) et 1µl d'ADN dans un tampon 1X.

Parfois, des souches pures identifiées ont été cultivées sur un milieu adapté et une fraction de colonie ayant poussé sur ce milieu a été prélevé à l'aide d'un cure-dent stérile et ajouté directement aux 24 µl de mélange réactionnel.

Les ADN ont été amplifiés dans un thermocycleur modèle 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA). Les programmes d'amplification sont indiqués dans le Tableau 5.

#### **3.2.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les électrophorèses des produits PCR ont été réalisés en gel d'agarose 0,8% dans un tampon Tris borate EDTA (89 mM Tris base, 89 mM borate, 2 mM EDTA) contenant 5% de bromure d'éthidium.



L'ADN a été visualisé par observation du gel sous rayonnements ultraviolets. La taille des fragments d'ADN amplifiés a été estimée en comparant leur distance de migration à celle d'un marqueur de taille 100pb (Promega, Madison, USA).

### **3.2.4. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

#### **3.2.4.1. Electrophorèse SSCP**

Un mélange contenant 18,75% de formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0,25µl d'un standard de poids moléculaire interne Genescan 400HD Rox (Applied Biosystems, Foster City, USA) et 1µl de produit PCR purifié a été dénaturé pendant 5 minutes à 95°C et immédiatement refroidi dans la glace pour qu'ils adoptent une conformation secondaire simple brin séquence-dépendante. Ils ont ensuite été analysés par électrophorèse capillaire SSCP sur un ABI Prism 310 genetic analyser (Applied Biosystem, Foster city-USA) comme décrit par Duthoit et al. (2003). L'électrophorèse capillaire SSCP sépare les fragments de taille identique selon leur séquence car les repliements différents des fragments d'ADN simple brin affectent la vitesse de migration des molécules.

Pour tous les profils SSCP, la proportion de chaque pic a été calculée grâce à la formule suivante :  $P_i = a_i * 100 / \sum a_i$  où  $P_i$  représente la proportion de chaque pic  $i$  et  $a_i$  l'aire d'un pic.

#### **3.2.4.2. Identification des pics**

Afin d'identifier les pics, les profils SSCP des échantillons de fromages ont été comparés à ceux d'isolats ou à ceux de souches de références.

##### **3.2.4.2.1. Identification des pics des profils SSCP des fromages au lait cru**

Pour les fromages au lait cru (chapitre 3.1.1), les pics dominants des profils SSCP ont été assignés en comparant leur migration avec les migrations des séquences nucléotidiques de souches bactériennes isolées de Saint-Nectaire, de souches bactériennes isolées du rétentat du lait cru F5 ou de séquences nucléotidiques clonées.

Une librairie de clones a été constituée à partir de l'ADN extrait de l'échantillon de fromage présentant le plus grand nombre de pic dans son profil SSCP.

L'ADNr 16S a été amplifié avec le couple d'amorces w02-w18. Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume final de 25µl contenant 0,25 µM de chacune des amorces oligonucéotidiques, 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), 1 unité de Taq polymérase et 1µl d'ADN dans du tampon 1X contenant du MgCl<sub>2</sub>. Les conditions d'amplifications sont indiquées dans le tableau 5. Les amplifiats ont été clonés dans un vecteur pCRBlunt-II-TOPO et



transformés dans des cellules d'*Escherichia coli* puis les inserts plasmidiques ont été amplifiés par PCR avec les amorces M13F et M13R selon les recommandations du fabricant (Invitrogen SARL, Cergy Pontaise-France). Les ADNr 16S des clones ont été séquencés avec le primer w34 (Tableau 5) à l'aide d'un ABI Prism 310 genetic analyser (Applied Biosystem, Foster city-USA) comme décrit par Callon et al. (2003).

Chaque séquence a été comparée aux séquences de la base de données du NCBI en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Seules les similarités supérieures à 98% avec les séquences de la base de données ont été prises en compte.

#### **3.2.4.2.2. Identification des pics des profils SSCP des fromages aux communautés microbiennes reconstituées**

Pour les fromages aux communautés microbiennes reconstituées plus ou moins complexes de la première série d'expérimentations (fabrication 3.1.5), les pics des profils SSCP ont été assignés en comparant leur migration à la migration des séquences nucléotidiques des souches utilisées pour reconstituer les communautés microbiennes.

### **3.3. Paramètres physico-chimiques**

Les valeurs de pH des fromages de toutes les fabrications décrites dans le paragraphe 3.1 ont été mesurées avec un pH-mètre 926 VTV muni d'une électrode Ingold 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay-France). Les teneurs en extraits secs ont été déterminés selon la méthode de référence NFV 046282 (12/95).

Les teneurs en matière grasse, en matière protéique, les dénombrements de cellules somatiques et la lipolyse des laits ont été dosés par le Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières (LIAL) d'Aurillac.

### **3.4. Dosages des acides et des sucres**

#### **3.4.1. Préparation des échantillons de fromage pour le dosage des acides et sucres par méthode enzymatique**

Les teneurs en acide lactiques et en sucres de tous les fromages, à l'exception de ceux au lait pasteurisé inoculé avec différentes souches bactériennes (chapitre 3.1.4), ont été dosés par méthode enzymatique.

Six grammes de fromage ont été broyés dans 25 ml d'eau distillée au moyen d'un homogénéisateur à turbine (Ultra-Turrax, type 125, Grosseron S.A., Nantes-France) pendant 1 min à 9500 tours/min.





Après incubation à 40°C pendant 1h et centrifugation (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France) à 8800 rpm pendant 30min à 4°C, les surnageants ont été filtrés sur filtres sans cendre lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique (n°111, Durieux, Paris-France). Les teneurs en lactose, en galactose, en acides lactiques L et D ainsi qu'en acide acétique des filtrats ont été dosés par méthode enzymatique (Kit Enzyplus, Diffchamb, Lyon-France) selon le protocole du fournisseur.

### **3.4.2. Préparation des échantillons de fromage pour le dosage des acides et sucres par High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Seules les teneurs en acide lactique et en lactose des fromages au lait pasteurisé inoculé avec différentes souches bactériennes (chapitre 3.1.4), ont été dosés par HPLC.

Dix grammes de fromages broyés ont été laissés en contact avec 20 ml d'eau milliQ pendant 1 h à 70°C. Le tout a ensuite été broyé à l'ultra-turrax (type 125, Grosseron S.A., Nantes-France) pendant 2 min à 2500 tours/min jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène.

Pour le dosage des teneurs en lactate, 17 ml de solution de Carrez I (150g/l d'hexacyanoferrate de potassium) et 17 ml de solution de Carrez II (300g/l d'acétate de zinc) ont été ajoutés à la pâte homogène. Après homogénéisation par agitation manuelle, le mélange a été laissé en contact pendant 1 heure à température ambiante. Puis, 3,3 ml de NaOH (1N) sont ajoutés. La suspension a été ensuite pesée avant d'être filtrée sur filtres sans cendre lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique (n°111, Durieux, Paris-France).

Pour le dosage des teneurs en lactose, 10 ml de TCA à 24% sont ajoutés à la pâte homogène. Après homogénéisation par agitation manuelle, le mélange a été laissé en contact pendant 1 heure à température ambiante. La suspension a été ensuite pesée avant d'être filtrée sur filtres sans cendre lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique (n°111, Durieux, Paris-France).

Les teneurs en acides lactiques et en lactose des filtrats ont été dosés par HPLC au laboratoire Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires de l'INRA de Grignon.

### **3.5. Analyses des composés volatils**

Les composés volatils des fromages au lait pasteurisé inoculé avec des communautés microbiennes reconstituées plus ou moins complexes (fabrication 3.1.5) à 1, 15, 22 et 28 jours ont été analysés à l'Unité de Recherche Technologie et Analyses laitières de l'INRA de Poligny par

- « purge and trap » (extraction en espace de tête dynamique) suivie d'une séparation par Chromatographie en Phase Gazeuse (Hewlett Packard, Les Ulis-France) (CPG) et d'une détection par Spectrométrie de Masse (Hewlett Packard MSD 5973) (SM).



- la méthode de microextraction en phase solide (SPME) en mode espace de tête couplée à la CPG/SM

### **3.5.1. Analyse avec extraction par « purge and trap »**

Les échantillons de fromages ont été décongelés à 4°C puis découpés en 12 cubes pesant au total 10 g. Les 10 g d'échantillons ont été disposés dans une cartouche en verre laissée 30 min à température ambiante avant d'être connecté au système « purge and trap » (Hewlett Packard 7695 LSC 3000, Tekmar, Cincinnati, Ohio-USA) équipé avec un piège Tenax (Tenax n°1 trap, Hewlett Packard, Les Ulis-France) et un cryofuseur.

Les composés volatils sont entraînés pendant 15 min à 25°C par un flux d'hélium (40ml/l) jusqu'au piège Tenax. La température de la précolonne entre le « Purge and Trap » et le CPG descend à -150°C au moyen d'azote liquide afin de concentrer et stopper les vapeurs d'échantillons. La précolonne dans le cryofuseur est ensuite chauffée à 225°C pendant 2 min pour désorber les composés volatils vers la colonne chromatographique avec un débit d'hélium de 2 ml/min à 40°C.

Les composés volatils sont alors séparés sur la colonne chromatographique (60m X 0,32mm de diamètre intérieur X 1µm film thickness, RTX5, Restek, Evry-France).

L'analyse commence par un palier de la température du four de 6 min à 40°C, puis une augmentation de 3°C/min jusqu'à atteindre 230°C et enfin un palier à 230°C pendant 1 min.

La détection a été réalisée au moyen d'un détecteur de masse sélectif MSD 5973 (Hewlett Packard) par impact d'électron à 70eV. Les données ont été collectées dans une gamme de 29 à 206 unités de masse atomique. L'identification a été réalisée en comparant un spectre de données à des indices de rétentions de valeurs enregistrées. La quantité de chaque composé volatil a été exprimée en unité arbitraire d'aire de pics des ions spécifiques.

### **3.5.2. Analyse avec extraction en SPME**

Les acides gras volatils ont été analysés par SPME-CPG/SMC.

Deux grammes de fromage râpé ont été placés dans des flacons de 10 ml en verre épais (Supelco, L'isle d'Abeau-France) sertis avec des capsules d'aluminium munies d'un joint viton (Supelco, L'isle d'Abeau-France). Les échantillons ont été chauffés 40°C pendant 30 min. Le joint viton a été percé avec l'aiguille de la seringue. La fibre de polyacrylamide (0,75 mm) a été sortie de son fourreau dans l'atmosphère du flacon en évitant tout contact direct de la fibre avec l'échantillon afin que les composés extraits soient piégés sur la fibre.

Les composés volatils sont ensuite désorbés grâce au dispositif d'injection de l'appareil à CPG, puis injectés dans la colonne capillaire pendant 5 min. Les acides gras sont alors séparés sur la colonne



chromatographique (60m X 0,32mm de diamètre intérieur X 1µm film thickness, RTX5, Restek, Evry-France).

L'analyse commence par un palier de la température du four de 3 min à 40°C, puis une augmentation de 3°C/min jusqu'à atteindre 100°C suivi d'une augmentation de 10°C/min jusqu'à atteindre 240°C. La détection et l'identification sont réalisées dans les mêmes conditions que décrites dans le paragraphe 3.5.1.

### **3.6. Analyse de l'effet de la température, du pH et des teneurs en acide lactique D et en acide lactique L sur le comportement de *L. monocytogenes*.**

#### **3.6.1. Protocole expérimental**

Le plan d'expérience de Doehlert (Doehlert et al., 1970) a été choisi pour étudier l'effet de la température, du pH, des teneurs en acide lactique D et en acide lactique L sur la croissance de *L. monocytogenes*. Pour l'étude de k facteurs,  $k^2+k+1$  expérimentations sont nécessaires soit 21 expérimentations pour 4 facteurs. 7 niveaux de pH et de teneurs en acide lactique L ainsi que 5 niveaux de teneurs en acide lactique D et 3 niveaux de températures ont été testés. Les combinaisons des 4 facteurs ont été données par la matrice de Doehlert et sont présentées dans le tableau 6.

Les 7 valeurs de pH initiales qui ont été choisies sont les suivantes : 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0 et 6,2. Les teneurs en acide lactique L ont été échelonnées de 3mg/g en 3mg/g sur un intervalle compris entre 0,00 mg/g à 18mg/g. Les 5 teneurs en acide lactique D testées sont : 0,00 mg/g, 1,25 mg/g, 2,50 mg/g, 3,75 mg/g et 5,00 mg/g. Ces valeurs ont été sélectionnées car de telles concentrations ont été dosées dans les fromages.

Les températures 10°C, 21°C et 32°C représentent des stades de fabrication de fromages. 10°C est la température d'affinage, 21°C est la température du fromage en sortie de presse et 32°C est la température de lait en début de fabrication.

#### **3.6.2. Préparation de la souche de *L. monocytogenes* et des milieux de culture**

*L. monocytogenes* S1 a été cultivée à 37°C pendant 18 heures dans un milieu Trypticase Soja additionnée d'extrait de levure (TS-YE). La culture a ensuite été centrifugée à 8000 rpm pendant 10 min à 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). Le culot cellulaire a été lavé et remis en suspension dans une solution de Ringer (Biokar diagnostic, Pantin-France). *L. monocytogenes* a ensuite été inoculée à une concentration de 50 à 100 UFC/25ml dans un milieu TSc (Thèse de Alomar J.) stérilisé 10 min à 110°C et composé de 17g/l de tryptone (Biokar diagnostic, Pantin-France), de 3g/l de peptone (Biokar diagnostic, Pantin-France), de 15 g/l de caséine (Promilk 852B, Ingredia, Arras-France).

combinaisons	Facteurs			
	Acide lactique D (mg/ml)	Acide lactique L (mg/ml)	pH	Température (°C)
1	2,5	9,00	5,6	21
2	5	9,00	5,6	21
3	3,75	18,00	5,6	21
4	3,75	12,00	6,2	21
5	3,75	12,00	5,8	32
6	0	9,00	5,6	21
7	1,25	0,00	5,6	21
8	1,25	6,00	5,0	21
9	1,25	6,00	5,4	10
10	3,75	0,00	5,6	21
11	3,75	6,00	5,0	21
12	3,75	6,00	5,4	10
13	1,25	18,00	5,6	21
14	2,5	15,00	5,0	21
15	2,5	15,00	5,4	10
16	1,25	12,00	6,2	21
17	2,5	3,00	6,2	21
18	2,5	9,00	6,0	10
19	1,25	12,00	5,8	32
20	2,5	3,00	5,8	32
21	2,5	9,00	5,2	32

**Tableau 6: Matrice de Doehlert à 4 facteurs**

1 à 21 : combinaisons différentes testées

Le milieu de culture TSc a été préféré au milieu TS-YE car il mime mieux les conditions rencontrées dans le lait et il ne s'acidifie pas ou peu lorsque *L. monocytogenes* s'y développe.

Au préalable, les milieux de culture ont été additionnés, en conditions stériles, d'acide lactique D (Biochemica, Sigma Aldrich, Saint-Louis-USA), d'acide lactique L (Biochemica, Sigma Aldrich, Saint-Louis-USA) aux concentrations indiquées dans la matrice (Tableau 6). Le pH des milieux a ensuite été ajusté, en conditions stériles, à l'aide d'un pH-mètre 926 VTV muni d'une électrode Ingold 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay-France).

### **3.6.3 Dénombrement de *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* a été dénombrée après 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48 et 192 h d'incubation sur milieu gélosé M17.

### **3.6.4 Activité antilisteria en milieu gélosé de certains alcools, esters et furanes**

L'activité antilisteria de certains alcools, esters et furanes a été testée selon la méthode de Tagg et McGiven modifiée par l'utilisation d'un double couche de gélose (cf. 3.2.2.2). Les puits creusés dans la gélose ont été remplis par 50µl de différentes concentrations d'alcools, esters et furanes et recouvert par de la paraffine stérile.

## **3.7. Analyse statistique**

Le logiciel Statistica (StatSoft 2003, version 6.1, Tulsa, USA) a été utilisé pour analyser statistiquement les données soit par analyse de variances (ANOVA) soit par Analyses en Composantes Principales (ACP) soit par régression linéaire multiple. Un test de Newman-Keuls a été réalisé lorsque les différences étaient significatives.





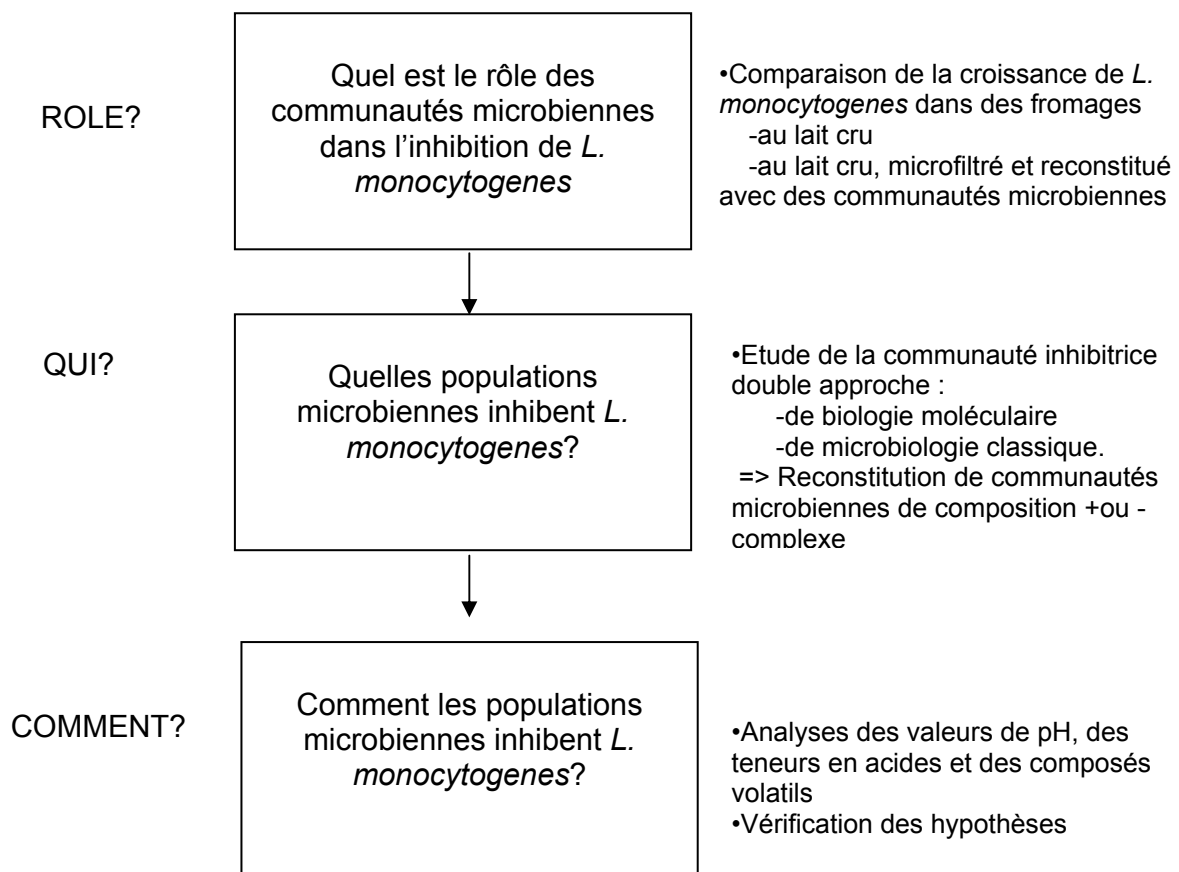
La partie des résultats est structurée en 5 grands chapitres.

Les chapitres 1 et 2 traiteront de la mise en évidence du rôle des communautés microbiennes dans l'inhibition de *L. monocytogenes* (schéma ci-dessous).

Les chapitres 3 et 4 ont pour objectif de déterminer :

- quelles sont les populations microbiennes impliquées dans l'inhibition de *L. monocytogenes* par l'utilisation d'une double approche : une approche de biologie moléculaire et une approche de microbiologie classique.
- comment les populations microbiennes inhibent *L. monocytogenes*. L'incidence de la production d'acides et de composés volatils sur le développement de *L. monocytogenes* sera évaluée.

Dans le chapitre 5, les hypothèses émises d'après les résultats du chapitre 4 sur les capacités antilisteria des composés métaboliques dans l'inhibition de *L. monocytogenes* seront vérifiées.



**Schéma : stratégie d'approche**



# RESULTATS



## 4. Résultats

### 4.1. Chapitre 1 : Les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber le développement de *L. monocytogenes* dans des fromages au lait cru ?

Cette première partie de thèse avait pour objectif de déterminer si des écosystèmes microbiens étaient capables d'inhiber le développement de *L. monocytogenes* dans des filières fromagères traditionnelles en prenant le cas du fromage A.O.C. Saint-Nectaire. Elle s'insérait dans un programme AQS<sup>1</sup> qui avait débuté avant mon arrivée au laboratoire .

A cette fin, la croissance de 2 souches de *L. monocytogenes* dans des fromages fabriqués avec les laits crus de 6 exploitations a été comparée selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.1.1 du Matériel et Méthodes.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication<sup>2</sup> parue dans International Journal of Food Microbiology dont le texte est inclus dans cette thèse. Ils ont montré que :

- en début de fabrication, les deux souches de *L. monocytogenes* étaient inhibées dans la pâte des fromages fabriqués avec les laits crus de trois des six productions étudiées. Cette inhibition pourrait s'expliquer entre autres par une acidification de la pâte en dessous de 5,2 dès le premier jour d'affinage et par la production d'acide lactique L entre 1 et 8 jours (concentrations supérieures à 14 mg/g),
- après 8 jours d'affinage, *L. monocytogenes* ne se multiplie dans la pâte d'aucun des fromages au lait cru. Des facteurs autres que la diminution des valeurs de pH et la production d'acides lactiques pourraient être impliqués dans l'inhibition de *L. monocytogenes*,
- aucune relation n'a été mise en évidence entre les numérations de *L. monocytogenes* et celles des autres flores microbiennes,
- la croissance de *L. monocytogenes* à la surface des fromages débute à 8 jours quand les valeurs de pH sont supérieures à 5,32,
- le plus faible développement de *L. monocytogenes* est observé à la surface des fromages ayant les plus basses valeurs de pH, fromages sans croissance de *L. monocytogenes* dans la pâte.

---

<sup>1</sup> : Les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber le développement de *Listeria monocytogenes* dans les filières fromagères traditionnelles ? Le cas du fromage AOC Saint-Nectaire . Projet AQS 2001-2004-Financement DGAL-Arilait Recherches.

<sup>2</sup> Millet L., Saubusse M., Didienné R., Tessier L., Montel M.C. 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses. International Journal of Food Microbiology. **108**: 105-114



# Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses

L. Millet <sup>a</sup>, M. Saubusse <sup>a</sup>, R. Didienne <sup>a</sup>, L. Tessier <sup>b</sup>, M.C. Montel <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unité de Recherches fromagères INRA-URF, 36 rue de Salers 15000 Aurillac, France

<sup>b</sup> Unité de Recherches en Technologie et Analyses Laitières, INRA Place du Champs de foire Poligny 39801, France

Received 7 July 2005; received in revised form 5 September 2005; accepted 6 November 2005

## Abstract

The development of *Listeria monocytogenes* in cheeses made with raw-milk originating from six different farms and according to the Saint-Nectaire cheesemaking technology was studied. Milk was inoculated with two strains of *L. monocytogenes* at 5 to 10 CFU/25 ml. Microbial and chemical analyses were carried out at appropriate intervals during ripening. *L. monocytogenes* did not grow in the cores of cheeses prepared with milk originating from three farms. That inhibition could be partially attributed to the pH values and L-lactate content. There was no growth in cheeses with pH below 5.2 and lactate content around 14 mg/g. In all cheeses, *L. monocytogenes* stopped growing in the cores of cheeses after eight days and some other factors may be involved in the inhibition. No relation was found between *L. monocytogenes* count and other microbial counts. Growth occurred on cheese surfaces between eight and eighteen days, when the pH significantly increased. The lowest *L. monocytogenes* growth was found on the surface of cheeses with the lowest pH and without any core growth.

Further studies will be performed to clarify the involvement of the microbial community in *L. monocytogenes* inhibition, in particular during the ripening period.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; Inhibition; Raw-milk cheeses

## 1. Introduction

Consumers' interest in safer cheeses with high organoleptic characteristics is increasing. Traditional raw-milk cheeses are recognised as outstandingly tasty products with diverse and complex characteristics (Cimons, 2001). Microorganisms play a major role in and are an intrinsic part of this process, although they must be controlled to prevent pathogen occurrence. Indeed, the level of pathogens in cheese must comply with European legislation and regulations. Raw-milk cheeses have been pointed out as risk products, despite the fact that they are safer now than in the past. Effectiveness of *Listeria monocytogenes* control in milk production has improved as a result of regular inspections, application of HACCP-type programmes and effective hygienic practices. Recent milk studies have shown a low occurrence of *L. monocytogenes* and contamination levels below 0.1 CFU/ml (Meyer-Broseta et al., 2003). The risk of *L. monocytogenes* contamination equally

involves raw-milk cheeses and those made with pasteurised, microfiltered milk because post-process contamination is possible (Rudolf and Scherer, 2001).

There is plenty literature on *L. monocytogenes* dealing with its genome sequence (Glaser et al., 2001), virulence factors and their expression (Vazquez-Boland et al., 2001; Ermolaeva et al., 2004), susceptibility to acids or to microbial compounds like bacteriocins (Samelis et al., 2003), resistance to acid stress (Gahan et al., 1996; Hill et al., 2002) and its growth modelling in consideration of temperature, pH, organic acids and salt (Tienungoon et al., 2000; McKellar et al., 2002; Le Marc et al., 2002). All these data provide strategies to inhibit *L. monocytogenes* and to improve the control of this species. Nevertheless, resistant strains can emerge when a specific antimicrobial substance is used (Gravesen et al., 2002; Loessner et al., 2003). Some data suggest that the “hurdle approach”, which may occur in fermented products such as raw-milk cheeses, could be a promising alternative to pathogen control by heating or physical processing of the milk. For example, Eppert et al. (1997) mentioned that *Listeria innocua* was inhibited on the surface of certain red smear cheeses. Brouillaud-Delattre et al. (1997) found that *L. monocytogenes*

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 71 45 64 10; fax: +33 4 71 45 64 13.  
E-mail address: [cmontel@clermont.inra.fr](mailto:cmontel@clermont.inra.fr) (M.C. Montel).





growth was lower in raw than in sterilised milks and varied according to the strains. In a review on raw-milk cheese safety, Donnelly et al. (2001) indicated that raw-milk may have a protective effect against pathogenic bacteria.

It therefore appeared interesting to explore the way in which *L. monocytogenes* develops in raw-milk cheeses. The Saint-Nectaire raw-milk technology was chosen as a model because acidification is slow and ripening only takes 28 days, and it may be more favourable to *L. monocytogenes* development than those of more acid, cooked or hard cheeses ripened over several months (Yousef and Marth, 1990; Donnelly, 2001). The study design will include three parts, to be reported in three successive publications; this one is the first publication, comparing and exploring *L. monocytogenes* growths between cheeses made with raw-milks from different farms of the Saint-Nectaire area. The second part of the study will describe microbial communities to try and explain *L. monocytogenes* behaviour and the third one will compare *L. monocytogenes* behaviour between microfiltered and raw-milk cheeses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cheese preparation

#### 2.1.1. Milk collection

Six farms (F1, F2, F3, F4, F5, F6) were selected according to the results from a previous study (DGAL report, 2004). They were differentiated by their milk production practices and milk and cheese microbial counts (microbial counts on different media listed in “microbial analysis” below, occurrence of *L. monocytogenes*). Milk samples were collected from these

different farms immediately after milking and after inoculation of the starter culture used daily by the farmers. They were transported under refrigerated conditions in less than 2 h to the cheese experimental laboratory of INRA. Two milk samples were collected on each cheesemaking day.

### 2.2. Cheese manufacturing

Small cheeses (400 g) were made with the milk samples collected and according to a Saint-Nectaire-type technology. Milk samples were heated to 33 °C upon arrival. Eight cheeses were made from each milk sample (F1 to F6) for each experiment as indicated in Fig. 1. The same day, two milk samples from two different farms were processed for cheese preparation. The *L. monocytogenes* strains were cultured and prepared as described below. Then, 2 ml of calf rennet (Beaugel 520-Ets Coquard, Villefranche sur Saône-France) were also added. Forty-five minutes after rennet addition, the curd was cut and gently stirred to eliminate whey. The curds were moulded and pressed for 24 h at 2.1 bar. Pressing temperature was reduced from 24 to 18 °C in 7 h until the pH value reached 5.6. Each cheese surface was salted with 20 g of salt at the beginning of pressing.

After one day of ripening, the surfaces of 4 cheeses prepared with milk that was not inoculated with *L. monocytogenes* were surface inoculated with the same *L. monocytogenes* strains (5 to 10 CFU/25 cm<sup>2</sup>).

All cheeses were ripened for 28 days in INRA's ripening cellars under identical conditions at 10 °C with 95% relative humidity.

All the experiments were repeated three times on different dates over a one-month period.

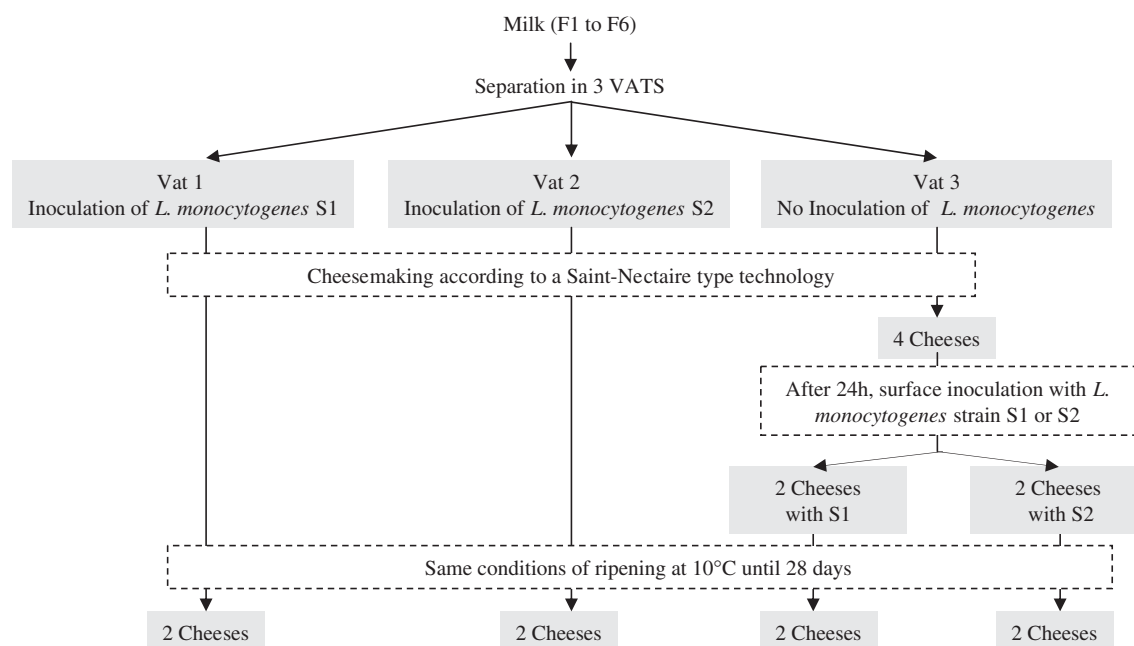


Fig. 1. Experimental protocol for the production of Saint-Nectaire type cheeses inoculated with *L. monocytogenes* strains S1 or S2 in the milk (5 to 10 CFU/25 ml of milk) or inoculated at the surface (5 to 10 CFU/25 cm<sup>2</sup>).



### 2.3. *L. monocytogenes* strains

Two *L. monocytogenes* strains were selected on the basis of their origin and their genomic profiles. They were typed by determining their Rep-Profile according to the method of Jersek et al. (1999) and their ribotype. Ribotyping was performed on riboprinter (RiboPrinter® system Dupont Qualicon, DuPont UK, StevenageHerts SG1 4QN, UK) by using their riboprint database for the identification. Strain S1 was isolated from Saint-Nectaire cheeses and belonged to rep-Group (15a); its ribotype was DUP 1038 (Millet et al., 2002). Strain S2 was isolated from cow's faeces in a Saint-Nectaire farm and belonged to rep-Group (5a), its ribotype being DUP 1039 (Millet et al., 2002). They were cultured in skimmed milk for 24 h at 37 °C, then frozen in skimmed milk with glycerol (10%) at –80 °C until milk sample inoculation. Milk samples were inoculated with *L. monocytogenes* concentrations of 5 to 10 CFU/25 ml of milk. It had been checked that they were not naturally contaminated by *L. monocytogenes* before inoculation.

### 2.4. Sampling

Samples were taken from inoculated-milk cheeses on days 1, 8, 18 and 28 of ripening for microbial analysis.

### 2.5. Microbial analysis

Cheese samples were prepared as follows. One hundred grammes of cheese were mixed with 25 ml phosphate buffer pH 7.5 (Gomri, 1946). The mixture was blended for 2 min with a stomacher (MIX 1, AES Laboratoire, Combourg — France). This cheese suspension was used for all microbial analyses and appropriate dilutions were plated on different media.

### 2.6. Microbial flora count

The count of *L. monocytogenes* in the different milks and cheeses was determined according to ISO 11 2090 prescriptions.

Analyses were carried out in milk and cheeses at different ripening stages (1, 8, 18 and 28 days) on the following media: thermophilic bacteria on M17 agar (Terzaghi and Sandine, 1975) incubated at 42 °C for 48 h; facultatively heterofermentative lactobacilli on FH agar medium (Isolini et al., 1990) incubated at 37 °C for 3 days under anaerobic conditions (Anaerocult A, WWR International SAS, Fontenay-sous-bois — France); *Leuconostoc* producing dextrans on Mayeux, Sandine and Elliker (MSE) agar medium with 10% saccharose incubated at 30 °C for 48 h (Mayeux et al., 1962); enterococci on Slanetz and Bartley medium (SB) (Slanetz and Bartley, 1957) incubated at 42 °C for 48 h; yeasts on OGA (oxytetracycline glucose agar) medium at 25 °C (Mossel et al., 1962a), ripening bacterial flora CRBM (Cheese Ripening Bacteria Medium) medium at 25 °C (Denis et al., 2001), Enterobacteriaceae on Violet Red Bile glucose agar (VRBG) at 42 °C for 24 h (Mossel et al., 1962b), coagulase positive staphylococci on Baird Parker (BP) agar with rabbit plasma at

37 °C for 48 h (De Buyser et al., 2003), *Pseudomonas* and Gram negative bacteria on CFC agar (Cetrimide-Fucidine-Cephalosporine) 5 days at 25 °C (Mead and Adams, 1977), and lactococci on Turner medium with 100 ppm of nalidixic acid (Turner et al., 1962). Ready-to-use media were purchased from Biokar Diagnostics (Biokar Diagnostics, rue des Quarante Mines, Beauvais — France).

### 2.7. Chemical analyses

Somatic cell counts were determined in a fluoro-opto electronic counter (Fossomati 500, Foss system, Hillerød, Denmark) according to IDF reference 148 A.

Milk fat and protein contents were determined by the infrared method (Combifoss 5400, FOSS France S.A., Nanterre Cedex — France). Cheese pH was measured with a pH meter 926 VTV with Ingold electrode 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay — France). Dry matter content was determined according to the method of reference NFV 046282 (12/95).

D- and L-lactate, acetate, galactose and lactose contents were determined using the spectrometric method recommended in the kits EnzyPlus of Diffchamb (kits EnzyPlus Diffchamb France SARL, Lyon — France). The results were expressed as milligramme per gramme of wet material.

### 2.8. Data analysis

Counting results were expressed as Colony Forming Unit (CFU) per gramme in milk, cheese cores and on cheese surfaces. Values were then converted to Log for statistical analysis.

According to the ISO standardized detection threshold of *L. monocytogenes*, its milk concentration (count) was estimated at 5 CFU/g (0.2 Log/g). To take the milk-to-curd concentration factor into account, milk *L. monocytogenes* counts were multiplied by ten for statistical analysis.

For each variable measured at different ripening times, standard analysis of variance was performed to compare the effects of two factors. The first factor was the origin of the milk samples (6 levels = F1 to F6 farms), the second one was the strains inoculated (2 levels = S1 or S2 strains). Three repetitions were taken into account. When the differences were significant, a Newman–Keuls test was performed. A mixed model was also used for certain microbial data to analyse growth curve differences between factors (Pinheiro and Bates, 2000). The results are presented as an ANOVA. The following model was used  $Y = \text{FarmMilk} + \text{Time} + \text{Time}^2 + \text{FarmMilk} : \text{Time} + \text{FarmMilk} : \text{Time}^2 + \varepsilon$ ;  $Y$  being the variable to be predicted, FarmMilk represents the effect of the factor used to differentiate milk origin i.e. determine global mean differences between milk origins, Time and Time<sup>2</sup> refer to the global evaluation of the curve shape represented by a polynomial of degree 2, FarmMilk : Time and FarmMilk : Time<sup>2</sup> correspond to the effect of the milk origin of the shape of the growth curve, i.e. on both the slope and the curvature of a polynomial of degree.

A Principal Component Analysis was performed with the data obtained at eight days for *L. monocytogenes* count, acid



Table 1

Protein (g/L) and fat contents (g/L), somatic cell counts of the milks, dry matter (%) in core cheeses at different times of ripening following inoculation with *L. monocytogenes* strains 1 or 2

Milk	Milk			Dry matter in cheese core			
	Fat content	Protein content	Cell number	Day 1	Day 8	Day 18	Day 28
F1	35.27	32.23	122333	50.17	53.83a	53.35ab	56.28a
F2	37.27	32.23	105000	51.53	53.40a	54.17a	55.31a
F3	35.73	32.80	279333	50.17	51.00ab	53.29ab	54.55ab
F4	37.97	34.07	160000	52.50	51.50ab	51.87ab	53.74ab
F5	38.7	32.87	258000	49.83	51.33ab	54.22a	55.17a
F6	33.43	32.27	122333	49.09	49.65b	50.69b	52.21b
P	NS	NS	NS	NS	**	**	**

Values are the means of 3 experiments with each milk (F1 to F6) inoculated with *L. monocytogenes* strains S1 or S2. In the same column, letters (a, b, ab) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b are classified in decreasing order (a>b). Means in the same column with different letters were significantly different by the Newman–Keuls statistical test. P = the significance levels (NS = non-significant, \*\* =  $p < 0.01$ ).

and sugar contents using Statistica software (Statsoft version 6, Maison Alfort-France).

### 3. Results

#### 3.1. Milk and cheese characteristics

The fat, protein contents and somatic cell counts of the milks from the different farms are shown in Table 1. Protein contents varied from 32 to 34 g/kg whereas fat contents varied from 33.43 to 38.7 g/kg; the lowest of all were found in the milk from farm F6.

Significant differences in DM content were found between the different cheeses. At different times of ripening, F6 cheeses had the lowest DM content whereas F2 and F5 had the highest. DM content increased in the course of ripening from  $51 \pm 0.7$  to  $55.6 \pm 1.7$ .

Table 2

Effect of farm milk (F1–F6) on the growth of *L. monocytogenes* strains S1 and S2 in cheese cores

Farm milk	Strain S1			Strain S2		
	Mean	TS	TQ	Mean	TS	TQ
F1	2.32a	4.9a	−3.43b	1.95a	6.48a	−1.25b
F2	2.56a	3.82a	−2.19ab	2.14a	2.79a	−2.52ab
F3	2.36a	5.76a	−3.66b	1.88a	6.56a	−0.19b
F4	1.36b	−0.24b	0.1a	0.97b	−0.84b	0.41a
F5	0.93b	−1.5b	0.63a	0.66b	−1.61b	0.22a
F6	0.78b	−1.41b	0.5a	1.13b	0.61b	0.87a
P	**	***	***	**	***	***

The results of *L. monocytogenes* counts (Log UFC/g) in milk and cheeses on days 1, 8, 18, 28 for 3 experiments with each milk were taken into account for statistical analysis using the mixed model of Pinhero and Bates (2000). In the same column, letters (a, b, ab) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b are classified in decreasing order (a>b). Mean (Farm milk term), TS (Farm milk: time), TQ (Farm milk: time<sup>2</sup>/slope) are the different terms used in the mixed models  $Y = \text{Farm-Milk} + \text{Time} + \text{Time}^2 + \text{FarmMilk} : \text{Time} + \text{FarmMilk} : \text{Time}^2 + \varepsilon$ . Mean, TS, TQ in the same column with different letters were significantly different by statistical test. P = the significance levels (NS = non-significant, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

#### 3.2. Growth of *L. monocytogenes* and pH in the core of cheese

The growth of the two *L. monocytogenes* strains (S1, S2) is shown in Fig. 2. None of the two strains grew in F4, F5 or F6 cheeses.

In F1, F2 and F3 cheeses, the *L. monocytogenes* count increased mainly during the first day and peaked at 1 to 2.5 Log CFU/g after eight days. The highest level was reached in F2 cheeses. After eight days, *L. monocytogenes* counts remained stable throughout the rest of ripening in all cheeses.

A statistical analysis of the results is presented in Table 2. Unsurprisingly, the results clearly show that *L. monocytogenes* developed in a significantly different manner according to milk origins. Regardless of the *L. monocytogenes* strain used for inoculation, there were two types of growth curves. The first

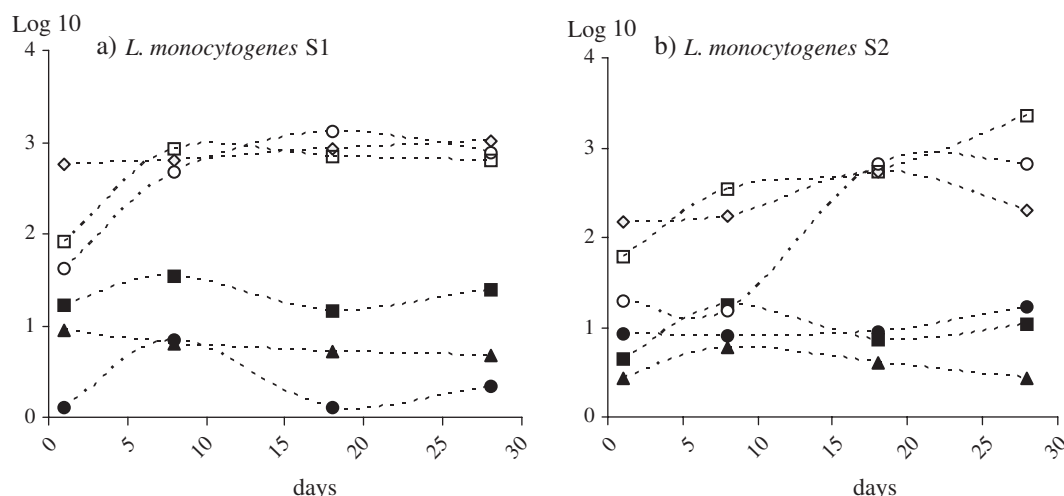


Fig. 2. Evolution of *L. monocytogenes* strains S1 or S2 in Saint-Nectaire-type cheeses prepared with 6 different milks (F1 to F6): —□— F1; —○— F2; —◇— F3; —▲— F4; —■— F5; —●— F6. The milks were inoculated with *L. monocytogenes* strains S1 (a) or S2 (b). The results are the means of three experiments.



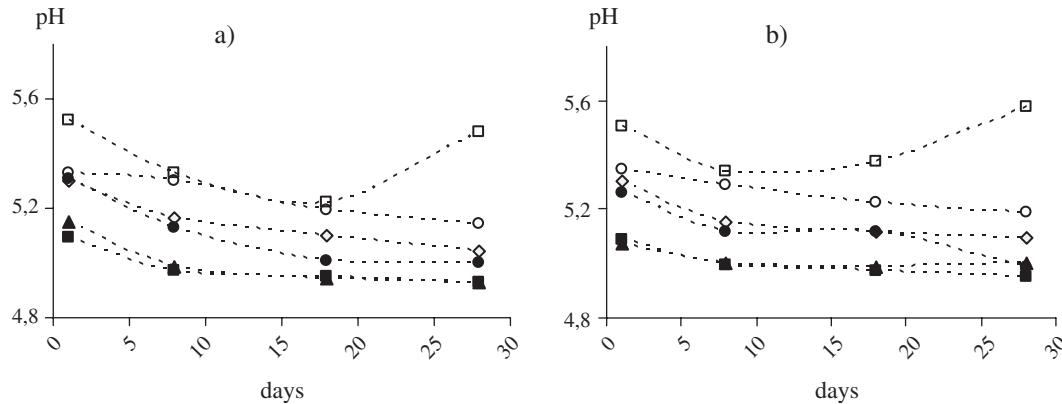


Fig. 3. Evolution of pH in Saint-Nectaire-type cheese cores prepared with 6 different milks (F1 to F6): —□— F1; —○— F2; —◇— F3; —▲— F4; —■— F5; —●— F6. The milks were inoculated with *L. monocytogenes* strains S1 (a) or S2 (b). The results are the means of three experiments.

one, observed in F4, F5 and F6 cheeses made from milk samples, was characterised by lower levels of *L. monocytogenes* and therefore by an absence of growth, as expressed by a very small slope and almost no increase. The second one, observed in F1, F2 and F3 cheeses, was defined by a higher level of *L. monocytogenes* and therefore by a growth curve reaching a maximum threshold (significant slope and curve). The highest development of S2 *L. monocytogenes* in cheese cores was recorded in F1 and F3 cheeses.

Taking all cheeses into account, both *L. monocytogenes* strains exhibited similar growth curves (Table 2).

The pH variations between the different cheeses are shown in Fig. 3. Statistical analysis elicited statistically significant differences in pH values between the various cheese cores on day 1, day 8 and day 18 but not on day 28 (Table 3). Regardless of the *L. monocytogenes* strain inoculated, acidification was quicker and remained low (pH 4.97) in F4 and F5 cheeses, whereas in F1, F2, F3 cheeses it was slower from days 1, 8, 18 and reached significantly higher pH values.

On day 1 and day 28, pH and *L. monocytogenes* counts were better correlated with strain 2 than with strain 1 (for strain S1  $r=0.32$  on day 1 and  $r=0.41$  on day 28, for strain S2,  $r=0.74$  on day 1 and  $r=0.7$  on day 28,  $n=18$ ). On day eight and

day 18, *L. monocytogenes* counts and pH were significantly correlated with both strains (on day 8 for S1 and S2  $r=0.66$  and  $0.57$ , respectively; on day 18 for S1 and S2,  $r=0.61$  and  $0.67$ , respectively).

### 3.3. Acid and sugar contents in cheese cores

The results are summarised in Table 4. On days one and eight, F4 and F5 cheeses could be distinguished from the others by their higher L-lactate (approximately 14 mg/g) and acetate (around 0.10 mg/g) contents and lower D-lactate and lactose contents. They were the cheeses with the lowest pH and *L. monocytogenes* count. F2 cheeses differed from others in their higher D-lactate content.

On day 8, the PCA results presented in Fig. 4a revealed that the acid, sugar contents and *L. monocytogenes* count accounted for more than 70% of the inter-cheese variance. Most of these variables were well correlated to axis 1. There was a relationship between the S1 *L. monocytogenes* count and L-lactate ( $r=-0.66$ ;  $n=18$ ), D-lactate ( $r=0.66$ ;  $n=18$ ) or lactose contents ( $r=-0.66$ ;  $n=18$ ). There was no significant correlation with acetate ( $r=-0.36$ ;  $n=18$ ) and galactose contents ( $r=0.01$ ;  $n=18$ ). Galactose content was negatively correlated to that of D-lactate ( $r=-0.5$ ). The cheese spacing (Fig. 4b) indicates that all the cheeses made with the three milks from farms F4, F5 and F6 could be grouped together. They were characterised by low *L. monocytogenes* count, low pH and higher L-lactate content. The cheeses from the other farms (F1, F2, F3) were more scattered, indicating greater inter-cheese variations between the different variables.

On day 28, lactose consumption was complete in all cheeses. L-lactate and acetate contents had decreased whereas the D-lactate had increased (Table 4). L-lactate content remained the highest in F4 and F5 cheeses. The most significant L-lactate decrease between days 8 and 28 was observed in F6 cheeses. The D- and L-lactate total content did not change between days 8 and 28. The D-lactate and acetate contents did not differentiate the various cheeses. No correlation was found between these biochemical variables and *L. monocytogenes* counts.

Table 3  
pH values in the cheese cores prepared with six different milks (F1–F6) inoculated with *L. monocytogenes* strains S1 and S2

Milk	Day 1		Day 8		Day 18		Day 28	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
F1	5.52a	5.50a	5.33a	5.34a	5.34a	5.37a	5.48	5.58
F2	5.30a	5.30a	5.17ab	5.51bc	5.12ab	5.12ab	5.04	5.10
F3	5.33a	5.34a	5.30ab	5.29ab	5.22ab	5.22ab	5.14	5.19
F4	5.09c	5.09c	4.97c	4.99c	4.99b	4.99b	4.93	4.95
F5	5.15b	5.16b	4.98c	5c	4.97b	4.97b	4.93	5.00
F6	5.27b	5.26b	5.14b	5.11c	5.12ab	5.12ab	4.99	5.31
P	**	**	***	***	**	*	NS	NS

The values are the mean values of 3 experiments with each milk. In the same column, letters (a, b, c) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b, c are classified in decreasing order ( $a > b > c$ ). Means in the same column with different letters were significantly different by Newman–Keuls statistical test. P = the significance levels (NS = non-significant, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ).





Table 4

Contents (mg/g) of L-lactate, D-lactate, acetate, lactose and galactose in cheeses prepared with 6 different milks (F1–F6) and inoculated with *L. monocytogenes* strain S1

Milk	Galactose			Lactose			L-lactate			D-lactate			Acetate		
	D 1	D 8	D 28	D 1	D 8	D 28	D 1	D 8	D 28	D 1	D 8	D 28	D 1	D 8	D 28
F1	4.56	3.91b	0.41	4.98	5.77	0.14	8.86	8.38	5.94b	0.30	0.44	4.58	0.01	0.01b	0.00
F2	7.33	3.44b	0.49	4.83	2.41	0.55	7.84	7.94	5.53b	0.03	3.15	5.38	0.01	0.03ab	0.00
F3	6.19	6.98a	2.88	4.74	3.45	0.21	9.16	10.50	7.60ab	0.03	0.43	2.99	0.03	0.04b	0.00
F4	3.67	2.02b	0.90	3.59	1.03	0.14	10.35	12.42	8.59ab	0.05	0.99	3.64	0.10	0.07b	0.01
F5	4.75	4.71b	1.69	2.66	0.76	0.14	13.31	13.62	9.27a	0.00	0.04	5.72	0.04	0.12a	0.01
F6	4.48	4.97b	0.43	7.20	2.38	0.07	6.79	12.02	6.07ab	0.02	0.31	4.55	0.03	0.03ab	0.00
	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	***	NS	NS	*	NS

Values are the mean of three experiments with each milk (F1–F6). In the same column, letters (a, b, ab) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b are classified in decreasing order (a>b). Means in the same column with different letters were significantly different by Newman–Keuls statistical test. P = the significance levels NS = non-significant, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . D = day of ripening.

### 3.4. Microbial counts

There was no significant effect of milk origin on the counts of the flora cultured on the following media: Baird Parker (enumeration of coagulase positive staphylococci), M17 (enumeration of thermophilic bacterial flora), VRBG (enumeration of Enterobacteriaceae) OGA by counting only moulds and CFC (enumeration of *Pseudomonas*). Considering the overall ripening time, global microbial counts on Baird Parker (enumeration of coagulase negative flora), on FH (enumeration of facultative heterofermentative lactobacilli), SB (enumeration of enterococci) and OGA (enumeration of yeasts) media significantly differed between cheeses prepared with different milks, as shown in Table 5. F4 and F5 cheeses had significantly lower microbial counts than other cheeses on the following media: BP (enumeration of coagulase negative flora) but with a

higher time slope, FH, OGA (enumeration yeasts), SB and CRBM. F4 cheeses had a lower count on MSED+ (counting colonies producing dextrans on MSE medium) than F5 cheeses. F1, F2, and F6 cheeses were characterised by a higher flora count on FH and MSED+ media. The time slope of the growth curve on FH medium was stronger than that calculated on other media and was particularly important in F1 and F3 cheeses. F3 cheeses were distinguishable from the others by their lower yeast count on OGA.

As *L. monocytogenes* inhibition occurred at the beginning of ripening, it was important to try and correlate *L. monocytogenes* counts with other microbial counts. On day 1, no obvious relationship was found between *L. monocytogenes* and other counts. The highest correlation was computed on day 8 with the counts on OGA medium ( $r=0.41$ ), CFC medium ( $r=0.58$ ), turner medium ( $r=-0.45$ ) and the count of

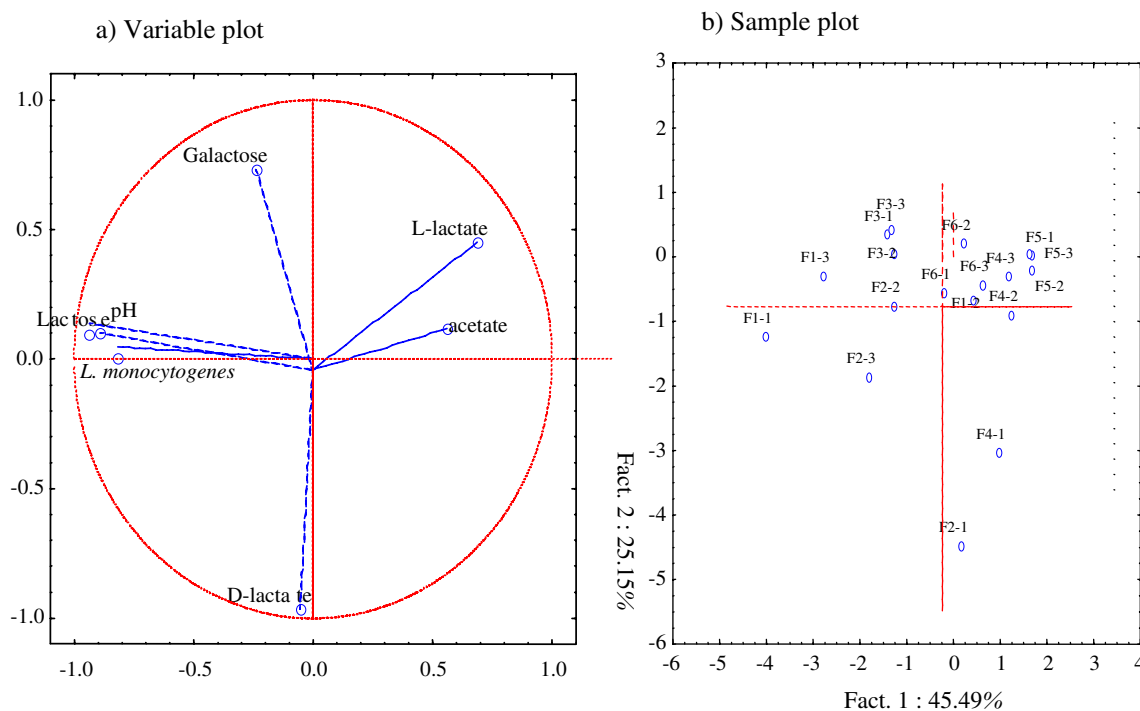


Fig. 4. Principal Component Analysis. a) Projection of variables on factorial plan. The variables were the values at 8 days of ripening for pH, acids (D-lactate, L-lactate, acetate), lactose, galactose contents and *L. monocytogenes* (S1 strain) count. b) Projection of samples which were cheeses prepared with different milks (F1 to F6) in three different experiments (indicated after — by a number 1 to 3) and analysed at day 8 of ripening.



Table 5

Effect of farm milk (F1–F6) on the growth of microorganisms in the core cheese counted on the following media: BP = coagulase negative bacteria on Baird Parker, SB = enterococci on Slanetz and Bartley, OGAI = yeast on OGA medium, FH = lactobacilli on Isolini medium, MSED = *Leuconostoc* producing dextran on MSE medium, CRBM = ripening bacteria on CRBM medium

Milk	BP			SB			OGAI			FH			MSED			CRBM		
	Mean	TS	TQ	Mean	TS	TQ	Mean	TS	TQ	Mean	TS	TQ	Mean	TS	TQ		TS	TQ
F1	4.96a	3.17	−5.73	5.54a	8.84	−5.78	5.96a	1.54	−6	5.7ab	16.01	−6.59	5.94a	8.05b	−6.55ab	6a	4.46	−3.43
F2	4.67a	1.01	−3.25	4.55bc	6.66	−5.42	5.62ab	2.22	−5.82	6.29a	10.85	−1.43	5.59a	10.87ab	−9.33bc	5.59ab	3.82	−2.19
F3	4.33ab	2.57	−3.47	5.28ab	6.65	−6.21	4.43d	5	−4.04	5.29b	14.23	−2.89	5.21ab	14.62a	−12.52c	5.94a	5.75	−3.66
F4	3.78b	3.24	0.13	3.77c	4.76	−4.55	4.87bcd	3.59	−3.39	5.21b	14.26	−2.6	3.93c	12.63ab	−3.27a	5.1b	0.24	0.01
F5	4.16ab	3.82	−5.26	4.01c	8.12	−2.83	4.16cd	5.63	−3.69	5.52b	12.89	−1.65	4.71ab	9.36ab	−3.8a	5.52ab	−1.5	0.63
F6	4.85a	0.5	−1.51	5.98a	6.02	−3.41	5.34abc	1.91	−5.72	6.05ab	12.14	−3.63	5.79a	7.56b	−6.01ab	6.17a	−1.41	0.5
P	(*)	*	NS	**	NS	NS	*	NS	NS	**	***	NS	***	***	***	*	NS	NS

The results of *microbial* counts (Log UFC/g) in milk and cheeses on days 1, 8, 18, 28 for 3 experiments with each milk were taken into account for statistical analysis using the mixed model of Pinheiro and Bates (2000). In the same column, letters (a, b, c) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. (a, b, c, ...) are classified in decreasing order (a>b>c). Mean (Farm milk term), TS (Farm milk : time), TQ (Farm milk : time<sup>2</sup> slope) are the different terms used in the mixed models  $Y = \text{FarmMilk} + \text{Time} + \text{Time}^2 + \text{FarmMilk} : \text{Time} + \text{FarmMilk} : \text{Time}^2 + \varepsilon$ .

Mean, TS, TQ in the same column with different letters were significantly different by statistical test. P = the significance levels (NS = non-significant, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

colonies producing dextrans on MSE medium ( $r = 0.52$ ). These relationships may indicate either that the bacterial flora influenced *L. monocytogenes* growth, or that all microorganisms were perhaps influenced by the same factors.

### 3.5. Growth of *L. monocytogenes* and pH on cheese rind

On days 18 and 28, regardless of the strain inoculated in the milk, *L. monocytogenes* rind counts were significantly higher in F1, F2, and F3 cheeses (Table 6), consistently with cheese core results. Both *L. monocytogenes* strains showed the same behaviour. They did not grow during ripening between days 18 and 28. On day 8, pH values and *L. monocytogenes* counts were the lowest in F5 cheeses (Table 7). On day 28, pH values were significantly higher in F1 and F3 cheeses, corresponding to a higher *L. monocytogenes* count.

The two strains spread on the surface did not grow until day 8 except for F3 cheeses, but their count increased considerably between days 8 and 18 and less so between days 18 and 28. On

day 18, their rind counts were significantly higher in F3 and F1 cheeses and lower in F2 and F4 cheeses. Rind counts increased dramatically in F6 cheeses between days 18 and 28. At all inoculation levels, pH values increased between days 18 and 28 in F1, F3 and F6 cheeses (Table 7). The highest values on day 28 were found in F1, F6 and F3 cheeses, which had the highest *L. monocytogenes* count. Conversely, when pH did not increase, as in F4 and F5 cheeses, *L. monocytogenes* count remained stable.

*L. monocytogenes* rind counts did not correlate well with pH. The strongest correlation between *L. monocytogenes* count and pH ( $r = 0.53$ ) was measured on day 18 with the strain inoculated on the surface.

With all the *L. monocytogenes* strains used for inoculating milk or cheese surfaces, rind and core counts on day 8 were the same whereas on days 18 and 28 they were significantly higher on the surface than in the core of cheeses (Table 8). This can be attributed to pH being significantly higher on the surface than in the core.

Table 6

Counts (Log UFC/g) of *L. monocytogenes* on the cheese rind prepared with 6 different milks (F1–F6) and ripened at 10 °C

Milk	a) Inoculation in milk		b) Inoculation on the surface		
	Day 18	Day 28	Day 8	Day 18	Day 28
F1	3.77ab	4.02a	1.34b	3.02ab	3.69ab
F2	3.84ab	3.75a	0.98b	1.86b	3.28b
F3	4.51a	4.38a	2.89a	4.64a	5.02a
F4	2.18b	2.34ab	0.53b	2.29b	2.70b
F5	1.75b	1.48b	0.79b	2.69ab	2.91b
F6	2.24b	2.37ab	0.84b	2.61ab	4.05ab
P	*	*	***	*	***

a) After inoculation of *L. monocytogenes* in the milk, b) after inoculation strains of *L. monocytogenes* at the surface at day 1.

The data are the mean values of 3 experiments for each milk sample with each S1 and S2 *L. monocytogenes* strains. In the same column, letters (a, b, ab) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b are classified in decreasing order (a>b). Means in the same column with different letters were significantly different by Newman–Keuls statistical test; P = the significance levels (NS = non-significant, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

Table 7

pH at the surface of cheeses prepared with 6 different milks (F1–F6) and ripened at 10 °C

Milk	a) Inoculation in milk		b) Inoculation on the surface		
	18 days	28 days	8 days	18 days	28 days
F1	6.10ab	6.42ab	5.76a	6.17ab	6.34ab
F2	6ab	6.05bc	5.34b	6.02ab	6.06bc
F3	6.01ab	6.61a	5.40b	6.24a	6.77a
F4	5.84ab	6.03bc	5.39b	5.78ab	6.07bc
F5	5.61b	5.75c	5.32b	5.64b	5.75c
F6	5.93ab	5.92bc	5.56ab	5.95ab	6.41ab
P	*	**	***	*	***

a) After inoculation of *L. monocytogenes* in the milk, b) after inoculation strains of *L. monocytogenes* at the surface at day 1.

The data are the mean values of 3 experiments for each milk sample with each S1 and S2 *L. monocytogenes* strains. In the same column, letters (a, b, c, ...) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b, c are classified in decreasing order (a>b>c). Means in the same column with different letters were significantly different by Newman–Keuls statistical test. P = the significance levels (NS = non-significant, \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ).



Table 8

Comparison of *L. monocytogenes* counts (Log UFC/g) and pH values in the core or on the cheese rinds

Inoculation	Counting or pH	8 days		18 days		28 days	
		Counts	pH	Counts	pH	Counts	pH
Milk	Core	1.72	5.15	1.99b	5.10b	1.88b	5.14b
Milk	Surface	1.72	nd	3.12a	5.94a	3.05a	6.13a
Surface	Surface	1.36	5.48	2.82a	5.97a	4.03a	6.05a
P		NS		**	***	**	***

The values are the mean obtained in 3 experiments for cheeses prepared with six different milks (F1 to F6) and inoculated with S1 and S2 *L. monocytogenes* strains. In the same column, letters (a, b) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b are classified in decreasing order (a > b). Means in the same column with different letters were significantly different by Newman–Keuls statistical test. P = the significance levels (NS = non-significant, \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

On day 18, the surface counts of the strains inoculated in milk were well correlated with the core counts ( $r = 0.91$   $n = 36$ ). That correlation was weaker on day 28 ( $r = 0.73$  for strain S1,  $n = 18$ ;  $r = 0.78$  for strain S2  $n = 18$ ).

On day 18, there was no correlation between the rind counts of *L. monocytogenes* inoculated in milk and those measured with the strains spread on cheese surface.

#### 4. Discussion and conclusions

In our experimental conditions, both *L. monocytogenes* strains exhibited the same growth behaviour in Saint-Nectaire-type cheeses. Tienungoon et al. (2000) found two *L. monocytogenes* strains (Scott A and L5) to have the same growth characteristics in broth medium.

The results showed that *L. monocytogenes* was inhibited in the cores of cheeses prepared according to the Saint-Nectaire cheesemaking technology, with milk samples from three different farms. When growth occurred in the core, it was during the few early days of ripening and never after day 8. In Camembert cheeses, *L. monocytogenes* was shown to develop in cheese cores during ripening (Pearson and Marth, 1990) even if a *Lactococcus lactis* inhibitory strain producing nisin was added (Maisnier-Patin et al., 1992). *L. monocytogenes* was also able to grow in soft goat cheeses without any antimicrobial barriers such as pH, starter culture and salt (Olarte et al., 2000, 2002). The decrease in *L. monocytogenes* during ripening has often been observed in cooked cheeses and cheeses ripened for a longer period of time (Pearson and Marth, 1990).

In the early stages of ripening, temperature alone could not explain *L. monocytogenes* growth differences because it was the same with all cheeses (18 °C) and it did not act as an inhibitor. Therefore, the key factors involved in *L. monocytogenes* inhibition in the core of Saint-Nectaire-type cheeses from manufacture until day eight of ripening appeared to be the pH and the lactic acid content. In our manufacturing conditions, around 18 °C and independently of the lactate content, pH 5.2 values corresponded to the growth/no growth limit in most Saint-Nectaire-type cheeses on the first day (Fig. 5). Nevertheless, no growth was observed in three cheeses despite their lactate content and pH above 5.2. Our results confirm the

importance of pH and acid content in the inhibition of *L. monocytogenes*, as noted in cottage cheese or in feta cheeses (Pearson and Marth, 1990). In those cheeses however, growth stopped as pH dropped to 4.6. Le Marc et al. (2002) in their synthetic-medium, 20 °C-model, estimated that pH values between growth and no growth were dependent on L-lactate contents: pH 4.5 and pH 5 for 50 and 100 mM lactate, respectively. The undissociated forms of acids could be involved in the inhibition. The minimal inhibitory concentration of undissociated lactic acid was estimated as 8 mM in synthetic medium (Le Marc et al., 2002) and as 6.4 mM in vegetable broth medium (Breidt and Fleming, 1998). The undissociated acid concentrations in most of the experimental cheeses were below 8 mM on day 1 and alone could not explain the absence of *L. monocytogenes* growth.

*L. monocytogenes* growth on cheese rinds was delayed and occurred between days 8 and 18, when pH increased dramatically. *Listeria* spp. rind counts were only stable in F4 and F5 cheeses, whose pH did not increase. Such differences in *L. monocytogenes* growth have also been observed on the surface of red smear cheese (Eppert et al., 1997). Growth of *L. monocytogenes* was also delayed at the surface of Taleggio cheese when the pH was between 5.5 and 6 (Carminati et al., 1999).

It can be concluded from this study that controlling acidification in the early stages of the process is a key factor to effectively control the development of *L. monocytogenes* with low core contamination in raw-milk “Saint-Nectaire-type cheeses”. In future, it would be of interest to determine the microbial flora involved in the inhibition. For that purpose, a description of the microbial community by molecular methods has been undertaken and will be presented in a forthcoming

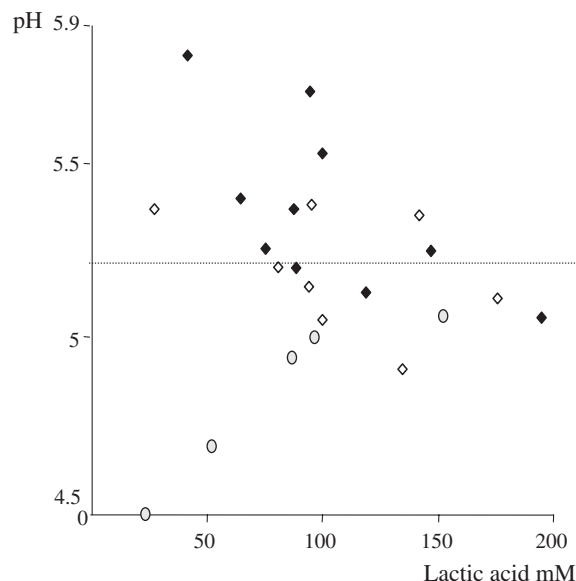


Fig. 5. Growth–no growth of *Listeria* strain according pH and lactic acid (mM). ◆ No growth of *L. monocytogenes* strain S1 in the different Saint-Nectaire cheeses (F1 to F6) at day 1 at 18 °C, ◆ growth of *L. monocytogenes* strain S1 in the different Saint-Nectaire cheeses (F1 to F6) at day 1 at 18 °C, ○ values corresponding to interface between growth and no growth of *L. innocua* in synthetic medium at 20 °C according to data obtained by Le Marc et al., 2002.



article. Further investigation would also be necessary to determine why *L. monocytogenes* stopped growing after 8 days of ripening. Factors other than pH and acid contents may be involved in the inhibition during ripening. The effect of a complex microbial community on *L. monocytogenes* growth will be studied by comparing growth in cheeses prepared with microfiltered or raw-milks. It will be the subject of the third article.

## Acknowledgements

The authors are indebted to ARILAIT RECHERCHES and CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'économie laitière) for intellectual and financial support. They also very sincerely thank René Lavigne, Béatrice Desserre for their technical assistance and Saint-Nectaire trade cheese. This work was financially supported by the financial AQS program of the French Ministry of Agriculture. English proofreading by Philip Rousseau-Cunningham.

## References

- Breidt, F., Fleming, H.P., 1998. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3159–3165.
- Brouillaud-Delattre, A., Maire, M., Collette, C., Mattei, C., Lahellec, C., 1997. Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International* 80, 913–919.
- Carminati, D., Neviani, E., Ottogalli, G., Giraffa, G., 1999. Use of surface-smear bacteria for inhibition of *Listeria monocytogenes* on the rind of smear cheese. *Food Microbiology* 16 (1), 29–36.
- Cimons, M., 2001. Food safety concerns drive FDA review of fine cheeses. *ASM News* 67, 1–6.
- De Buyser, M.L., Lombard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, P., Lahellec, C., 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999-Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *International Journal of Food Microbiology* 83, 185–194.
- Denis, C., Gueguen, M., Henry, E., Levert, D., 2001. New media for the enumeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81, 365–379.
- DGAL report 2004: report for Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) of a project on “les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber *Listeria monocytogenes* dans les filières fromagères traditionnelles?: cas du fromage Saint-Nectaire”.
- Donnelly, C.W., 2001. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw-milk: a review. *Bulletin of the International Dairy Federation* 369, 16–27.
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M., Scherer, S., 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4812–4817.
- Ermolaeva, S., Novella, S., Vega, Y., Ripio, M.T., Scotti, M., Vázquez-Boland, J.A., 2004. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Molecular Microbiology* 52 (2), 601–611.
- Gahan, C.G., O'Driscoll, B., Hill, C., 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3128–3132.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294 (5543), 849–852.
- Gomri, G., 1946. Buffers in the range of pH 6.5 to 9.6. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine* 6, 233–234.
- Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A.M., Mendes da Silva, J., Hansens, T.B., Knochel, S., 2002. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 756–764.
- Hill, C., Cotter, P.D., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal* 12, 273–283.
- Isolini, D., Grand, M., Glättli, H., 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 19, 57–59.
- Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1), 103–109.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219–237.
- Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S., Scherer, S., 2003. A Pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3), 1854–1857.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R., Richard, J., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72, 249–263.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R., 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 45, 655–656.
- McKellar, R.C., Lu, X., Knight, K.P., 2002. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73, 127–135.
- Mead, G.C., Adams, B.W., 1977. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *British Poultry Science* 18 (6), 661–670.
- Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Riviere, J., Cerf, O., 2003. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw-milk. *International Journal of Food Microbiology* 80, 1–15.
- Millet, L., Lamoine, L., Jouinot, M., Montel, M.C., 2002. Typage moléculaire de *Listeria monocytogenes* pour retracer l'origine des contaminations dans une filière fromagère. *Congrès lait Paris*.
- Mossel, D.A.A., Visser, M., Mergersink, W.H.J., 1962a. A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in food and beverages. *Laboratory* 11, 109–112. *Practical*.
- Mossel, D.A.A., Mengerink, W.H.J., Scholts, H.H., 1962b. Use of a modified MacConkey agar medium for selective growth and enumeration of all *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* 84, 381.
- Olarte, C., Sanz, S., Gonzalez Fandos, E., Torre, P., 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *Journal of Applied Microbiology* 88 (3), 421–429.
- Olarte, C., Gonzalez-Fandos, E., Gimenez, M., Sanz, S., Portu, J., 2002. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology* 19 (1), 75–82.
- Pearson, L.J., Marth, E.H., 1990. *Listeria monocytogenes*—threat to a safe food supply: a review. *Journal of Dairy Science* 73 (4), 912–928.
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects models in S and S-plus*. Springer-Verlag, New York. 528 pp.
- Rudolf, M., Scherer, S., 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 63, 91–98.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K.J., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2003. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4[deg]C in vacuum packages. *Food Microbiology* 20, 661–669.
- Slanetz, L.C.W., Bartley, C.H., 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* 74, 591–596.





- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29, 807–813.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4979–4987.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review* 14 (3), 584–640.
- Yousef, A.E., Marth, E.H., 1990. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of parmesan cheese. *Journal of Dairy Science* 73, 3351–3356.

	ES	MG	MP	Cell.	Lipolyse
PF5+MY	115,53	37,50 bc	28,70 a	8000 a	0,61 a
PF3+MY	117,96	42,85 c	27,55 a	9000 a	0,49 a
Lait cru F5	117,92	32,00 a	31,75 b	184500 b	0,93 a
Lait cru F3	118,50	34,55 ab	31,00 b	191500 b	1,69 b
PF5+RF3	115,51	38,25 bc	28,75 a	124500 ab	0,64 a
PF3+RF5	117,63	43,55 c	27,7 a	65000 a	0,53 a
PF5+RF5	115,55	38,00 bc	28,50 a	48500 a	0,63 a
PF3+RF3	117,82	43,30 c	27,65 a	52500 a	0,51 a
p	NS	*	*	*	**

**Tableau 7: Teneurs en matière grasse, en matière protéique, extrait sec, dénombrements des cellules somatiques et lipolyse des différents types de laits.**

F5 et F3 : exploitations d'origine des laits ; P : perméat, MY : ferment commercial, R : rétentat

ES : extraits secs en g/l ; MG : matière grasse en g/l ; MP : matière protéique en g/l ; Cell. : cellules somatiques en nombre de cellules/ml ; lipolyse en mEq/100 g de MG

Les valeurs sont les moyennes des teneurs de 2 répétitions.

p = niveau de significativité, NS : non significatif, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ . Dans la même colonne, les lettres a, b et c indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents ( $a < b < c$ ).

Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

## **4.2. Chapitre 2 <sup>3</sup> : Effet de l'épuration des laits sur la croissance de *L. monocytogenes***

### **4.2.1. Objectifs**

Afin de mieux cerner le rôle des composantes biotique (communauté microbienne) et abiotique (composition biochimique) dans l'inhibition de *L. monocytogenes* en cours d'affinage, la croissance de *L. monocytogenes* dans des fromages de type Saint-Nectaire fermier fabriqués avec du lait cru, du lait microfiltré et du lait reconstitué avec des communautés microbiennes issues de différents laits, a été comparée.

Compte tenu des résultats obtenus précédemment (chapitre 1), les laits de deux exploitations F3 et F5 ont été sélectionnés. La croissance de *L. monocytogenes* dans les fromages fabriqués avec ces laits était différente en début d'affinage. *L. monocytogenes* est inhibée dans les fromages fabriqués avec le lait F5 et se multiplie dans ceux fabriqués avec le lait F3.

Des fromages ont été fabriqués, selon une technologie de fabrication type Saint-Nectaire, à partir de lait cru, de lait microfiltré et de lait reconstitué avec des flores microbiennes issues de deux laits différents selon le protocole indiqué dans la partie 3.1.2 du Matériel et Méthodes.

### **4.2.2. Résultats**

#### **4.2.2.1. Caractéristiques des laits**

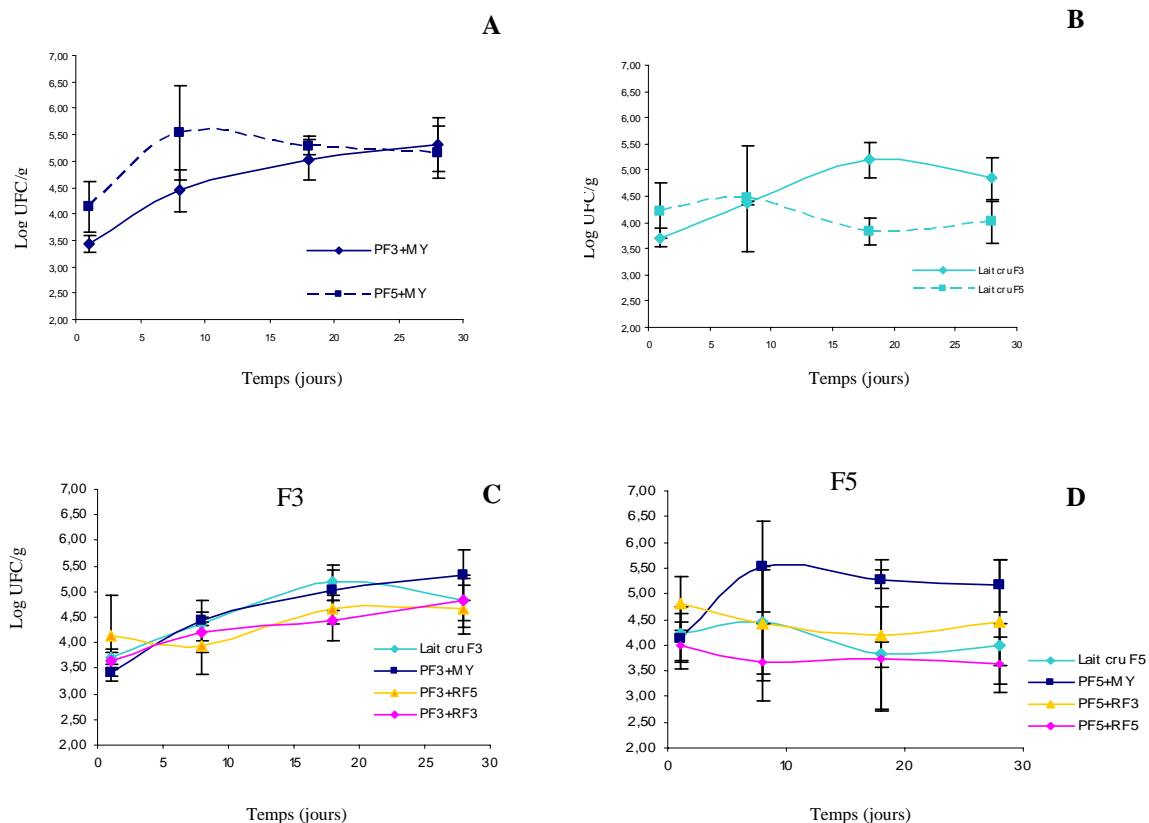
Les résultats des analyses en matière grasse, matière protéique, extraits secs, lypolyse et cellules somatiques des laits sont présentés dans le tableau 7.

Les valeurs d'extrait sec, non significativement différentes, varient de 115,51 g/l dans le lait microfiltré F5 auquel le rétentat F3 a été ajouté, à 118, 50 g/l dans le lait cru F3.

Des différences significatives en matière grasse, matière protéique, lypolyse et cellule somatiques ont été trouvées dans les différents types de lait. Les laits crus contiennent significativement plus de matière protéique (>31 g/l) et de cellules somatiques (>180000 cellules somatique/ml) que les autres laits et significativement moins de matière grasse (<35 g/l). Les laits microfiltrés F3 dans lesquels a été réincorporé ou non de la flore ont les plus fortes teneurs en matières grasse (>42 g/l).

---

<sup>3</sup> Ce travail a été réalisé dans le projet AQS, hors contexte de la thèse



**Figure 9 : Evolution de *L. monocytogenes* (log UFC/g) dans des fromages fabriqués avec un ferment commercial MY800, avec des laits crus ou des communautés microbiennes des deux laits réincorporées dans les perméats des laits**

Les données sont la moyenne de 2 répétitions.

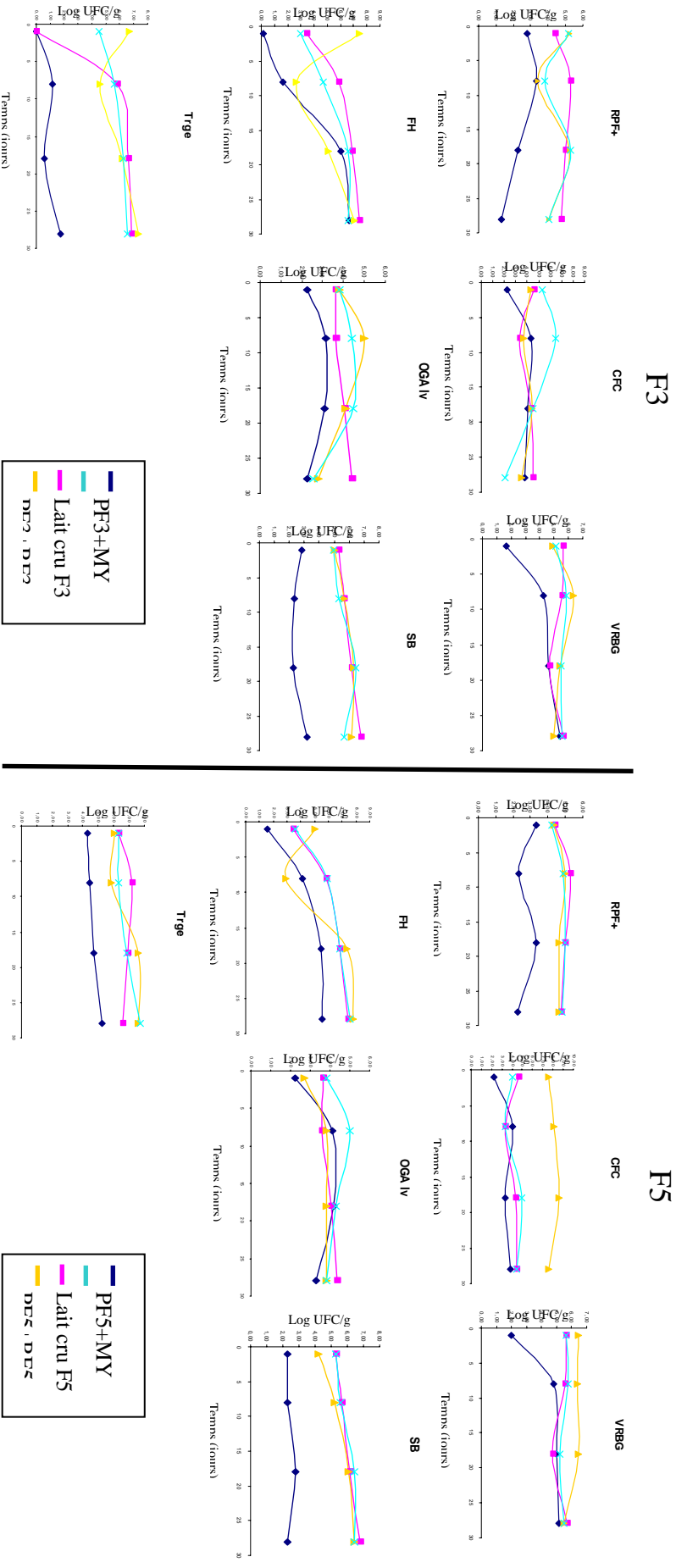
F5 et F3 : exploitations d'origine des laits ; P : lait microfiltré, MY : ferment commercial MY800, R : rétentat

**A** : Fromages au lait microfiltré F3 et F5 uniquement ensemencé avec le ferment commercial MY.

**B** : Fromages au lait cru F3 et F5

**C** : Fromages au lait cru F3, au lait microfiltré F3 et au lait microfiltré F3 inoculé avec les communautés microbiennes F5 ou F3

**D** : fromages au lait cru F5, au lait microfiltré F5 et au lait microfiltré F5 inoculé avec les communautés microbiennes F5 ou F3



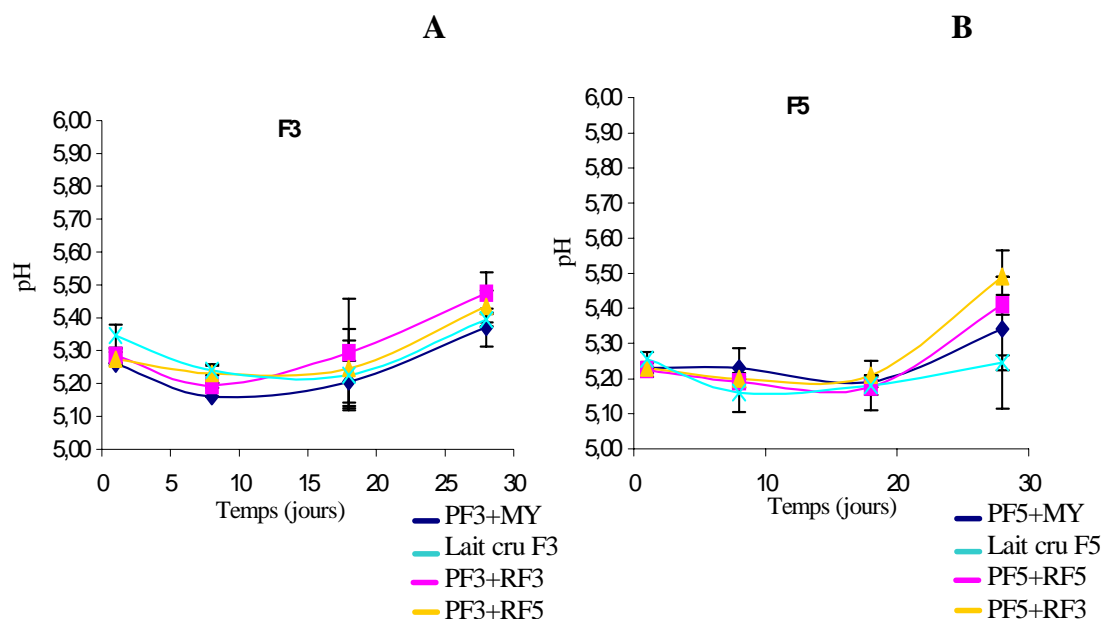
**Figure 10 : Exemples d'évolution des flores microbiennes dans les fromages au lait cru, au lait microfiltré, au lait microfiltré inoculé avec un rétentat**

Les données représentent la moyenne de deux répétitions. P : lait microfiltré ; R : rétentat, F3 et F5 : exploitations dont sont originaire les laits, MY : ferment commercial MY800

**A** : Fromages au lait cru F3, au lait microfiltré F3, au lait microfiltré F3 ensémené avec le rétentat F5 et au lait microfiltré F3 ensémené avec le rétentat F3.

**B** : Fromages au lait cru F5, au lait microfiltré F5, au lait microfiltré F5 ensémené avec le rétentat F5 et au lait microfiltré F5 ensémené avec le rétentat F3.

Les données sont les résultats des dénombrements sur les milieu suivants : RPF (comptage des colonies à coagulase positive), CFC (comptage des colonies fluorescentes), VRBG, FH, OGA (comptage des levures), SB, Trge (comptage des colonies rouges)



**Figure 11 : Evolution des valeurs de pH dans les fromages au lait cru, au lait microfiltré, au lait microfiltré inoculé avec un rétentat**

F3 et F5 : exploitations dont les laits sont originaires ; P : lait microfiltré; R : rétentat, F3 et F5 : exploitations dont sont originaire les laits, MY : ferment commercial MY800. Les valeurs de pH représentent la moyenne de 2 répétitions.

**A :** Fromages au lait cru F3, au lait microfiltré F3, au lait microfiltré F3 ensemencé avec le rétentat F5 et au lait microfiltré F3 ensemencé avec le rétentat F3.

**B :** Fromage au lait cru F5, au lait microfiltré F5, au lait microfiltré F5 ensemencé avec le rétentat F5 et au lait microfiltré F5 ensemencé avec le rétentat F3.

	<i>L. monocytogenes</i> 1j	<i>L. monocytogenes</i> 8- 28j	pH 1j	pH 8-28j
PF5+RF5	4,00 NS	3,68 a	5,23 a	5,26
Lait cru F5	4,23 NS	4,10 ab	5,26 a	5,20
PF5+RF3	4,82 NS	4,36 ab	5,23a	5,30
PF3+RF5	4,13 NS	4,42 ab	5,28 a	5,30
PF3+RF3	3,64 NS	4,49 ab	5,29 a	5,32
Lait cru F3	3,71 NS	4,80 ab	5,35 b	5,29
PF3 + MY	3,42 NS	4,93 ab	5,26 a	5,20
PF5 +MY	4,14 NS	5,32 ab	5,23 a	5,25

**Tableau 8 : Niveau de *L. monocytogenes* dans les fromages au lait cru, au lait microfiltré, au lait microfiltré inoculé avec un rétentat**

F3 et F5 : exploitations dont les laits sont originaires ; P : lait microfiltré; R : rétentat, F3 et F5 : exploitations dont sont originaire les laits, MY : ferment commercial MY800.

Les valeurs de *L. monocytogenes* et de pH représentent la moyenne de 2 répétitions.

NS : non significatif. Dans une même colonne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls à p<0,05

#### 4.2.2.2. Développement de *L. monocytogenes* dans les différents types de fromages

Les résultats de développement de *L. monocytogenes* sont donnés dans la figure 9.

La comparaison de la croissance de *L. monocytogenes* dans les fromages fabriqués avec les laits microfiltrés F5 et F3 (figure 9A) montre que les résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sont supérieurs à 1 jour d'environ 0,5 log UFC/g et à 8 jours d'environ 1 log UFC/g dans les fromages au lait microfiltré F5. Cependant, les niveaux de *L. monocytogenes* atteints à 18 et 28 jours sont similaires quelle que soit l'origine du lait microfiltré (F3 ou F5) avec lequel les fromages ont été fabriqués.

A 1 et 8 jours, la différence de niveau de *L. monocytogenes* entre les fromages au lait cru F5 et F3 est inférieure à 0,5 log UFC/g. Entre 8 et 28 jours, *L. monocytogenes* ne se multiplie pas dans les fromages au lait cru F5 (<4 log UFC/g) alors que sa croissance est supérieure à 1,5 log UFC/g dans les fromages au lait cru F3 (Figure 9B) (Tableau 8).

La réincorporation des flores microbiennes des laits F3 et F5 dans les laits microfiltrés F3 et F5 n'inhibe pas la croissance de *L. monocytogenes* à 1 jour (Figures 9C et 9D) (Tableau 8). Entre 8 et 28 jours, le niveau de *L. monocytogenes* tend à augmenter dans les fromages au lait cru F3 et au lait microfiltré F3 dans lequel la flore (rétenant) F5 ou F3 a été réincorporée pour atteindre à 28 jours un niveau similaire à celui du fromage au lait microfiltré F3 uniquementensemencé avec le ferment MY800 (Tableau 8). Par contre, dans les fromages au lait cru F5 et au lait microfiltré F5 dans lequel la flore (rétenant) F5 ou F3 a été inoculée, le niveau de *L. monocytogenes* est inférieur de plus d'1 log UFC/g à celui du fromage au lait microfiltré F5 uniquementensemencé avec le ferment MY800. Il tend à diminuer en cours d'affinage.

#### 4.2.2.3. Développement des autres flores microbiennes dans les différents types de fromages

L'évolution des flores microbiennes dans les divers essais est présentée dans la figure 10A pour les essais réalisés avec le perméat F3, et dans la figure 10B pour ceux avec le perméat F5.

De l'analyse des niveaux de flore sur les différents milieux, il ressort que :

- l'ensemencement des laits en flore thermophile était identique dans tous les essais, il est de l'ordre de 6 log UFC/g avec une multiplication entre 1 et 8 jours puis une stabilisation.

- une flore résiduelle proviendrait de la flore des laits microfiltrés, de la crème, ou pour les bactéries à Gram négatif de contaminations en cours de fabrication.

A 1 et 8 jours d'affinage, les niveaux de flore microbienne dans les fromages au lait microfiltré ensemencé avec le ferment commercial MY800 sont inférieurs de 1 à 3 log UFC/g à ceux notés dans les laits crus ou les laits microfiltrés inoculés avec de la flore de F5 ou F3. Les différences les plus importantes sont obtenues pour les dénombrements sur les milieux RPF (Staphylocoques à coagulase positive >3 log UFC/g), OGA (levures >3 log UFC/g), SB (>4 log UFC/g), FH (lactobacilles



<b>1j</b>	lactose	s lactose	galacto	s galacto	L lact	s L lact	D Lact	s D lact	L+D lact	s L+D lact
lait cru F5	4,65	0,07	8,75	1,06	8,52	2,66	0,21	0,14	8,73	2,53
lait cru F3	3,15	1,06	8,15	1,91	7,24	0,98	0,23	0,06	7,47	0,93
PF5+MY	3,45	1,20	7,35	1,20	6,91	0,15	0,14	0,19	7,04	0,34
PF3+MY	4,07	1,09	6,07	1,09	5,96	1,90	0,28	0,09	6,24	1,98
PF5+RF5	3,25	0,78	7,75	1,06	8,42	1,39	0,18	0,05	8,60	1,35
PF3+RF3	1,15	1,06	8,10	0,28	7,18	0,30	0,18	0,06	7,35	0,37
PF5+RF3	3,10	1,13	7,85	0,49	9,19	1,93	0,14	0,20	9,33	1,73
PF3+RF5	3,10	0,71	7,70	0,42	7,68	1,32	0,25	0,08	7,92	1,24
<b>8j</b>					<b>8j</b>					
lait cru F5	1,35	1,52	8,73	1,46	10,35	2,75	0,98	0,10	11,33	2,64
lait cru F3	1,37	1,36	9,10	0,59	8,29	0,41	1,03	1,03	9,32	0,61
PF5+MY	2,29	0,70	8,70	0,09	10,15	4,09	0,18	0,16	10,32	3,93
PF3+MY	1,37	0,09	7,45	0,34	8,86	0,86	1,33	1,74	10,19	2,60
PF5+RF5	1,25	1,77	7,52	1,10	9,03	2,25	1,46	0,32	10,48	2,57
PF3+RF3	1,44	0,37	7,83	1,07	8,58	0,98	1,29	1,35	9,87	0,37
PF5+RF3	0,54	0,76	8,28	0,57	9,73	2,13	0,62	0,08	10,35	2,05
PF3+RF5	1,08	1,52	8,47	1,56	8,06	0,02	1,26	0,71	9,32	0,69
<b>18j</b>					<b>18j</b>					
lait cru F5	0,71	0,51	2,64	0,20	6,31	0,32	3,19	0,33	9,49	0,01
lait cru F3	0,00	0,00	5,58	2,16	6,99	0,50	1,19	0,28	8,17	0,78
PF5+MY	0,54	0,76	4,76	0,27	5,17	2,42	1,43	1,75	6,60	0,67
PF3+MY	0,00	0,00	4,90	1,27	4,64	0,62	2,28	0,18	6,91	0,43
PF5+RF5	0,00	0,00	2,40	0,81	5,14	0,45	2,87	0,75	8,01	0,30
PF3+RF3	0,00	0,00	4,98	0,50	5,74	0,07	1,24	0,88	6,98	0,81
PF5+RF3	0,13	0,07	3,94	1,56	5,03	1,25	1,64	0,86	6,66	0,40
PF3+RF5	0,00	0,00	3,77	1,80	5,06	1,35	2,34	0,46	7,39	0,89
<b>28j</b>										
lait cru F5	0,06	0,04	1,49	2,05	4,71	1,97	0,48	0,12	5,19	2,09
lait cru F3	0,06	0,06	0,99	1,35	3,85	0,43	0,38	0,10	4,22	0,33
PF5+MY	0,00	0,00	0,56	0,79	2,63	0,56	0,23	0,21	2,85	0,15
PF3+MY	0,00	0,00	0,76	0,39	3,00	1,25	0,59	0,34	3,58	1,58
PF5+RF5	0,00	0,00	0,39	0,45	2,63	0,35	0,22	0,06	2,84	0,50
PF3+RF3	0,00	0,00	0,08	0,03	2,76	0,88	0,30	0,18	3,05	1,06
PF5+RF3	0,04	0,05	0,11	0,10	3,32	0,65	0,50	0,31	3,82	0,96
PF3+RF5	0,03	0,04	0,10	0,02	2,98	1,79	0,45	0,27	3,43	2,07

**Tableau 9 : Teneurs en lactose, galactose, D et L-lactate des différents fromages. Les résultats, exprimés en mg/g, sont la moyenne de deux répétitions.**

F3 et F5 : exploitations dont les laits sont originaires ; P : perméat ; R : rétentat, F3 et F5 : exploitations dont sont originaire les laits, MY : ferment commercial MY800; galacto : galactose ; L lact : L lactate ; D lact : D lactate ; L+D lact : L+D lactate ; Les valeurs représentent la moyenne de deux répétitions ; s : écart-type

mésophiles  $>3$  log UFC/g). A 8 jours, les niveaux de flore sur le milieu Turner sont corrélés à ceux en *L. monocytogenes* ( $r = -0,65$ ,  $n= 16$ ,  $p<0,05$ ).

A 18 jours et surtout à 28 jours les flores dénombrées sur les milieux OGA, FH et VRBG dans les fromages au lait microfiltré ensemencé uniquement avec le ferment commercial MY800 peuvent atteindre des niveaux similaires à ceux notés dans des fromages fabriqués au lait cru ou ceux fabriqués avec des laits microfiltrés inoculés avec les communautés microbiennes des laits F5 ou F3. Les niveaux des populations de levures diminuent entre 18 et 28 jours dans la plupart des fromages. Par contre, les flores dénombrées sur les milieux RPF, SB et dans une moindre mesure MSE se multiplient moins dans les fromages au lait microfiltré que dans les autres fromages.

#### **4.2.2.4. Evolution des valeurs de pH**

L'évolution des pH dans les fromages est indiquée dans la figure 11.

A 1 jour, les fromages au lait cru F3 ont les valeurs de pH les plus élevées (5,35) qui pourraient expliquer la croissance de *L. monocytogenes*. Les autres fromages ont des pH compris entre 5,23 et 5,29. A 8 et 18 jours, les valeurs de pH varient entre 5,16 et 5,25. Entre 18 et 28 jours, les valeurs de pH sont les plus élevées dans les fromages dont le lait a été inoculé avec la flore F3. Cependant, les coefficients de corrélation entre les valeurs de pH et la croissance de *L. monocytogenes* sont faibles ( $r=-0,48$  à 1 jour,  $0,16$  à 8 jours,  $0,20$  à 18 jours et  $0,15$  à 28 jours,  $n=16$ ,  $p<0,05$ ).

#### **4.2.2.5. Teneurs en lactose, galactose et acides**

Les données sur les teneurs en lactose, galactose et acides sont synthétisées dans le tableau 9.

A 1 jour, les plus fortes concentrations d'acide lactique L (9 mg/g) sont mesurées dans les fromages fabriqués avec le lait F5 que le lait soit cru, microfiltré ou reconstitué avec les flores de son propre lait ou celles de F3. Les plus faibles (6 mg/g) sont notées dans les fromages fabriqués uniquement avec le ferment commercial MY800. A ce stade, les teneurs en galactose varient entre 6 mg/g, valeur la plus faible dans les fromages fabriqués avec le lait F3 et ensemencés avec le ferment commercial MY800 et, 9 mg/g, valeur la plus forte dans les fromages au lait cru.

A 8 jours, les fromages fabriqués avec le lait microfiltré F5 et la flore microbienne F3 ont les plus faibles teneurs en lactose (0,54 mg/g) alors que ceux fabriqués avec le lait microfiltré F5 et le ferment commercial MY800 ont les plus fortes (2,29 mg/g). Les teneurs en acide lactique entre 1 et 8 jours ont surtout augmenté dans les fromages fabriqués avec uniquement le ferment commercial MY800. La différence de teneurs en acide lactique dans les fromages est inférieure à 2 mg/g. Les teneurs en acide lactique L à 8 jours ne sont que faiblement corrélées aux concentrations en *L. monocytogenes* ( $r=0,54$ ,  $n=8$ ,  $p<0,05$ ), les valeurs de acide lactique D le sont significativement ( $r=-0,81$ ,  $n=8$ ,  $p<0,05$ ).



Entre 8 et 18 jours les teneurs en acide lactique L diminuent alors que celles en acide lactique D augmentent particulièrement dans les fromages fabriqués avec le lait F5. A 18 jours, les concentrations en acides lactiques D et L sont les plus fortes dans les fromages fabriqués avec le lait cru F5, les plus faibles dans les fromages au lait microfiltré inoculé avec le ferment commercial MY800 uniquement. Le lactose est complètement consommé mais le galactose est encore présent avec les plus faibles concentrations dans les fromages fabriqués avec le lait F5 que celui-ci soit cru ou microfiltré. Seules les teneurs en acide lactique D sont significativement corrélées aux concentrations en *L. monocytogenes* ( $r = -0,64$ ,  $n=8$ ,  $p<0,05$ ).

Entre 18 et 28 jours, dans tous les fromages, le galactose est complètement consommé. Les teneurs en acide lactique D et L diminuent et les fromages au lait cru ont les plus fortes concentrations.

#### 4.2.3. Conclusions

Cette expérimentation nous a permis d'émettre des hypothèses sur la part des composantes biotique et abiotique de l'écosystème fromage sur l'inhibition de *L. monocytogenes* dans les fromages préparés avec les deux laits étudiés.

Ainsi il se dégage de cette étude que :

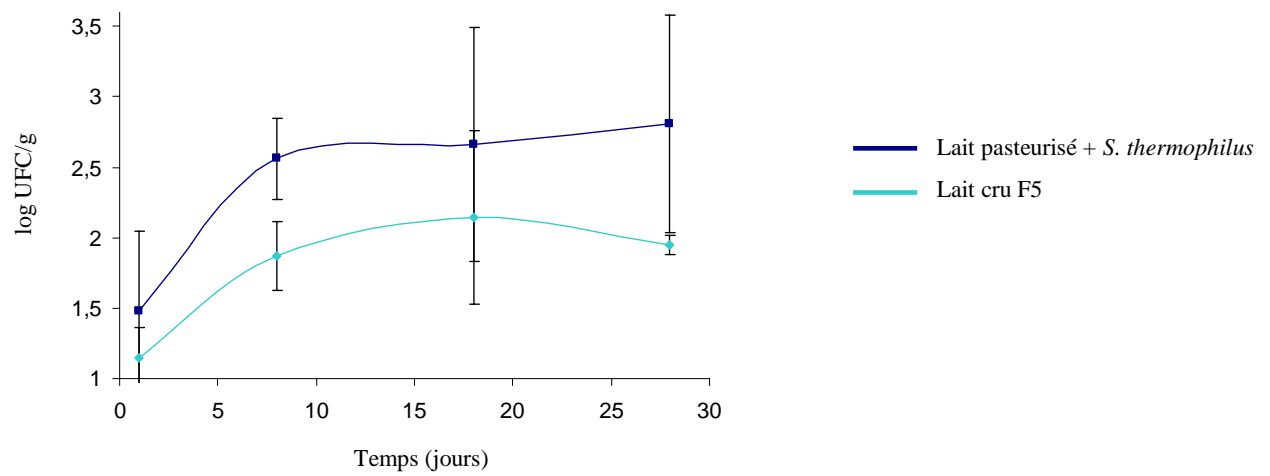
- la composante biochimique des deux laits n'expliquerait la différence de croissance de *L. monocytogenes* dans ces deux laits crus. En effet, dans les fromages fabriqués uniquement avec du ferment commercial MY800, la croissance de *L. monocytogenes* est similaire en cours d'affinage dans les deux laits microfiltrés mis en œuvre de teneur en matière grasse différente. Cette expérimentation ne permet cependant pas de conclure si les inhibiteurs naturels du lait contribuent à contrôler le développement de *L. monocytogenes*.

- les flores microbiennes du lait cru F5 seraient plus inhibitrices que celles de F3. Après 8 jours, l'inhibition la plus forte et la plus systématique est observée dans les fromages fabriqués avec le lait F5 (lait cru F5, lait microfiltré F5 inoculé avec des flores F3 ou F5). Cette inhibition pourrait être due à l'interaction des flores microbiennes avec la composition biochimique du lait.

- Les populations microbiennes, essentiellement les bactéries à Gram négatif et les bactéries lactiques qui se développent dans les fromages uniquement préparés avec le ferment commercial MY800 exerceraient peut-être un effet inhibiteur mais les flores microbiennes des laits crus sont cependant plus inhibitrices.

- l'inhibition en cours d'affinage ne serait pas attribuable aux valeurs de pH et aux teneurs en acide lactique L mais la production d'acide lactique D pourrait intervenir.

Sur la base de ces résultats, il nous a semblé important de focaliser le travail sur le rôle que la communauté microbienne du lait cru F5, pourrait jouer sur le développement de *L. monocytogenes*.



**Figure 12 : Croissance de *L. monocytogenes* dans des fromages au lait pasteurisé et au lait cru F5**

Les données représentent la moyenne de deux répétitions.

F5 : exploitation dont le lait est originaire; *S. thermophilus* : souche isolée d'un ferment commercial.

Les fabrications au lait microfiltré étaient lourdes à mettre en œuvre et ne garantissaient pas une absence de flores microbiennes résiduelles. Aussi, nous avons envisagé de poursuivre des études sur les capacités inhibitrices des communautés microbiennes dans des fromages au lait pasteurisé.

Au préalable, nous avons vérifié que les différences de croissance de *L. monocytogenes* en fromages au lait microfiltré étaient aussi observées dans ceux au lait pasteurisé fabriqué avec *S. thermophilus* et qu'ainsi de telles fabrications pourraient constituer un témoin positif (témoin de croissance de *L. monocytogenes*). Cette vérification a été faite par Charlène Dufour<sup>4</sup> dans le cadre d'un rapport d'IUT.

Ainsi, la croissance de *L. monocytogenes* a été comparée dans des fromages fabriqués avec du lait de l'exploitation F5 cru ou pasteurisé selon une technologie type Saint-Nectaire comme indiqué dans le Matériel et Méthodes chapitre 3.1.3. Les résultats de la figure 12 montrent clairement que la croissance de *L. monocytogenes* est plus importante dans les fromages au lait pasteurisé que dans ceux au lait cru.

Les fabrications au lait pasteurisé ont par conséquent été choisies pour la suite des études sur les capacités inhibitrices des communautés microbiennes dans les fromages.

---

<sup>4</sup> Dufour C., 2005 : Quelles sont les populations microbiennes d'un fromage au lait cru de type Saint-Nectaire associées à une inhibition de *Listeria monocytogenes* ?



### 4.3. Chapitre 3 : Analyse des populations microbiennes des fromages avec inhibition de *L. monocytogenes*

#### 4.3.1. Publication

Les résultats présentés dans les chapitres 1 et 2, nous ont interrogé sur

- la biodiversité microbienne qualitative et quantitative nécessaire pour inhiber *L. monocytogenes*.
- la redondance des fonctions inhibitrices : l'inhibition est-elle due à un seul individu ou à plusieurs ?

Pour répondre à ces questions nous avons choisi une double approche :

- la première approche visait à comparer par méthode moléculaire PCR-SSCP après amplification des régions V3 et V2, la composition des communautés microbiennes de fromages inhibiteurs ou non (cf. chapitre 1).
- la deuxième approche reposait sur l'identification des populations microbiennes du lait le plus inhibiteur et la détermination de leur capacité inhibitrice.

Les résultats de ces deux approches ont fait l'objet d'une publication présentée dans les pages suivantes <sup>5</sup>. Les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

Dans la première approche, les 6 fromages plus ou moins inhibiteurs de *L. monocytogenes* (cf. Table 2 de l'article précédent, Millet et al., 2006) ont été comparés à 8 jours par la technique SSCP en ciblant les régions V3 et V2 de l'ADNr16S. L'analyse des profils SSCP de la région V3 est peu informative en raison de la dominance d'un pic de *S. thermophilus*. Par contre, l'analyse de la région V2 de l'ADNr 16S extrait des 6 fromages (3 fromages avec inhibition de *L. monocytogenes*, 3 fromages sans inhibition de *L. monocytogenes*) a permis de les distinguer sur la base de leur profil SSCP. Les profils SSCP après amplification de la région V2 de l'ADNr 16S des fromages dans lesquels *L. monocytogenes* ne se développe pas, montrent une plus grande stabilité dans le temps (1 mois d'expérimentation) que ceux des fromages non inhibiteurs. Ils sont caractérisés par la présence des pics suivants : *E. faecium*, *E. saccharominimus*, *Chryseo sp.*, *Coryne. flavescens*, *Lc. lactis* et *Lc. garvieae*. Les capacités inhibitrices des souches appartenant à ces espèces ont été testées en fromages

---

<sup>5</sup> 5 : Saubusse M, Millet L., Delbès C., Callon C., Montel M.C. 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism – PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Sous presse





au lait pasteurisé (cf. chapitre 3 .1.4 du Matériel et Méthodes). La comparaison de la croissance de *L. monocytogenes* de ces fromages ainsi préparés a permis de conclure que :

- *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* et à un moindre niveau *E. saccharominimus* et *Coryne. flavescens* étaient capables d'inhiber *L. monocytogenes*.
- le dosage des acides et sucres par HPLC (les résultats sont détaillés pages 72 à 73) a montré que la production d'acides lactiques par *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* pourrait participer à l'inhibition de *L. monocytogenes*. La production d'acide lactique ne permet pas cependant d'expliquer l'inhibition de *L. monocytogenes* dans les fromages au lait pasteurisé inoculé avec *E. saccharominimus* ou avec *Chryseo sp.*

La deuxième approche a consisté à identifier et à déterminer les capacités inhibitrices des populations microbiennes du lait cru F5 le plus inhibiteur de *L. monocytogenes*. Les souches isolées du rétentat de microfiltration du lait ont été identifiées par séquençage de l'ADNr16S comme décrit dans le paragraphe 3.2.2.2 du Matériel et méthode. Leur pouvoir inhibiteur via la production de molécules autres que des acides a été testées sur gélose (cf. paragraphe 3.2.2.3 du Matériel et Méthodes). Quarante et une espèces bactériennes appartenant aux genres : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Rothia*, *Macrococcus*, *Brachybacterium*, *Kocuria*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Commamonas* et *Acinetobacter* ont été identifiées. Aucune des souches n'a produit de composés inhibiteurs de *L. monocytogenes* par la méthode de Tagg et McGiven (1987) modifiée par l'utilisation d'une double couche de gélose.

Afin de mieux cerner quelles espèces pourraient être impliquées dans l'inhibition, des communautés microbiennes de compositions plus ou moins complexe ont été reconstituées comme il sera présenté dans le chapitre 4.



# Application of Single Strand Conformation Polymorphism — PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*

M. Saubusse, L. Millet, C. Delbès, C. Callon, M.C. Montel \*

Unité de Recherches Fromagères URF 545, INRA, F-15000 Aurillac, France

Received 14 June 2006; received in revised form 17 November 2006; accepted 18 December 2006

## Abstract

The aim of this study was to compare the microbial communities of different cheeses where *Listeria monocytogenes* either grew or did not grow. For this purpose, (i) isolates from the most inhibitory cheese ecosystem were identified and their ability to produce anti-*Listeria* substances was determined, (ii) bacterial communities of cheeses with and without *L. monocytogenes* growth were compared using the Single Strand Conformation Polymorphism method.

The study showed SSCP to be an effective tool for differentiating between the bacterial communities of different cheeses manufactured with the same technology. All the cheeses with the lowest *L. monocytogenes* counts on day 8 were distinguished by the dominance in their SSCP profiles, after amplification of the V2 region of the 16S rRNA gene, of 3 peaks whose nucleotide sequences comigrated with *Enterococcus faecium* and *Enterococcus saccharominimus*, *Chryseobacterium* sp and *Corynebacterium flavescentis*, *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus lactis* respectively. However, no anti-*Listeria* compounds were produced under our experimental conditions.

These six bacterial species were inoculated, separately or together, into pasteurised milk and their anti-*Listeria* activity in cheese was evaluated. The area of inhibition between the control and trial curves confirmed that *L. monocytogenes* is inhibited by *E. saccharominimus*, *C. flavescentis*, *L. lactis*, *L. garvieae* and the mixture of all six bacterial strains.

Further studies should be performed to determine the metabolites involved in *L. monocytogenes* inhibition.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; Inhibition; Raw-milk cheeses; SSCP; Anti-*Listeria* compounds

## 1. Introduction

The safety of dairy products has been greatly improved throughout the food production chain by the implementation of Good Manufacturing Practices (GMP) and Good Hygienic Practices (GHP) and by the development and increasing application of the semi-quantitative Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system in “farm-to-fork” systems.

Safety can also be improved by eliminating milk pathogens by pasteurising or microfiltering raw milk. However, processing milk in these ways may have adverse effects on the typical organoleptic and sensory characteristics of traditional cheeses and does not prevent contamination by certain pathogens such as *Listeria monocytogenes*. Bio-preservation strategies based on the addition of inhibitory bacterial strains have been widely studied. Selecting bacterial strains that produce nisin (Maisnier-Patin et al., 1992; Olasupo et al., 1999) or other bacteriocins (Nunez et al., 1997; Ennahar and Deschamps, 2000; Buyong et al., 1998; Loessner et al., 2003) and/or organic acids (Ramsaran et al., 1998; Morgan et al., 2001; Millet et al., 2006) has been investigated as a method for inhibiting *L. monocytogenes* growth in cheeses. However, effective applications are scarce and the long-term effectiveness

\* Corresponding author. Unité de Recherches Fromagères INRA, 36 rue de Salers, 15000 Aurillac, France. Tel.: +33 4 71 45 64 10; fax: +33 4 71 45 64 13.

E-mail address: [cmontel@clermont.inra.fr](mailto:cmontel@clermont.inra.fr) (M.C. Montel).



of inhibitory strains has been questioned, mainly because of the occurrence of pediocin- and nisin-resistant pathogenic strains (Gravesen et al., 2002). A promising strategy could result from recent studies based on the hypothesis that natural flora can compete with food pathogens in cheese. Indeed, it has been shown that some ripening consortia from smear-ripened cheese (Maoz et al., 2003), and microbial communities from raw milk (Millet et al., 2006; Gay and Amgar, 2005) can inhibit *L. monocytogenes*.

The mechanism of inhibition in smear-ripened cheeses has yet to be understood (Maoz et al., 2003). The inhibition observed by Millet et al. (2006) in some raw-milk cheeses may be partly due to lower pH and acid production, but the microbial populations involved have not been identified. In complex cheese ecosystems, one method for identifying the populations involved in inhibition is to isolate the different strains that make up the bacterial community with anti-*Listeria* properties (Maoz et al., 2003). Such an approach is time-consuming and the strains may behave quite differently in laboratory media and in food products. A new approach for identifying the microbial populations associated with inhibition can be proposed, based on comparing the microbial communities of raw-milk cheeses where *L. monocytogenes* grows while others do not. This can be achieved by applying molecular tools that help describe the dynamics of microbial communities as a whole without having to culture any micro-organisms. Among these techniques, Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (TTGE and DGGE) (Cocolin et al., 2004; Ercolini et al., 2004; Ogier et al., 2004) and Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) (Duthoit et al., 2003, 2005) have been applied to food microbial ecology with increasing success.

The aim of this study was to identify microbial populations which can be involved in the inhibition of *L. monocytogenes* in cheeses previously studied by Millet et al. (2006). Two approaches were combined for this purpose. In the first, the isolates from most of the inhibitory cheese ecosystem were identified and their ability to produce anti-*Listeria* substances was determined. In the second, the SSCP method was used to compare the bacterial communities of cheeses with and without *L. monocytogenes* growth.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cheese samples

The cheese samples were those studied by Millet et al. (2006). As described by those authors, they were manufactured according to a Saint-Nectaire type technology using raw milk from six different farms (F1, F2, F3, F4, F5 and F6). With each milk, cheese was made three times over a one-month period. This study specifically investigated cheeses ripened for 8 days, because the differences in *L. monocytogenes* counts have been shown to be greatest after this ripening period. Moreover, most of the microbial flora counted in different media have been shown to be at the highest level at day 8 (Millet et al., 2006). Two groups of cheeses were

selected according to their respective *L. monocytogenes* counts. The first group, the F1, F2 and F3 cheeses, consisted of those with the highest *L. monocytogenes* counts, ranging between 1.26 and 3.58 log (CFU/ml). The second group, F3, F4 and F5, had the lowest *L. monocytogenes* counts (0.1 to 2.31 log CFU/ml).

### 2.2. Total genomic DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from 1 g cheese samples on day 8 by a phenol–chloroform method including treatment with zirconium beads as described by Duthoit et al. (2003).

### 2.3. PCR amplification

Total DNA extracted from cheeses sampled on day 8 was amplified with two sets of primers (Table 1): w34–w49 and V2F–V2R.

Forward primers w49 and V2F were labelled with 5'-fluorescein phosphoramidite HEX and reverse primers w34 and V2R with 3'-fluorescein phosphoramidite NED. All the primers were synthesised by Applied Biosystems (Foster City, USA).

PfuUltra™ High-Fidelity DNA polymerase (Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, Netherlands) was used for all PCR amplifications. PCR was performed in a total volume of 25 µl containing 10 µM of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1 µl of cheese-extracted DNA, 1× buffer and 1.25 U of PfuUltra™ High-Fidelity polymerase.

All the reaction mixtures were subjected to 30 amplification cycles in a thermocycler model 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR amplification conditions are reported in Table 1. PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel, in 0.5× Tris borate EDTA buffer (89 mM

Table 1  
PCR primers and amplification conditions used in this study

Primers	Sequence	Amplification conditions	References
w34	TTACCGCGGCGTGTGGCAC	3 min at 96 °C	Zumstein et al. (2000)
w49	ACGGTCCAGACTCTACGGG	30 cycles of: 30 s at 96 °C; 30 s at 61 °C; 30 s at 72 °C; 10 min at 72 °C	Delbes et al. (1998)
V2F	CGCGAACGGGTGAGTAA	3 min at 96 °C	Duthoit et al. (2003)
V2R	ACTGCTGCCTCCCGTAG	30 cycles of: 30 s at 96 °C; 30 s at 55 °C; 45 s at 72 °C; 10 min at 72 °C	Duthoit et al. (2003)
w02	NTACCTTGTTACGACTT	5 min at 96 °C	Godon et al. (1997)
w18	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	25 cycles of: 60 s at 96 °C; 30 s at 50 °C; 60 s at 72 °C	Godon et al. (1997)



Table 2  
Agar media, incubation time and incubation temperature used in this study

	Incubation time/ temperature (°C)	References
Medium 17 (M17)	72 h	30 Terzaghi and Sandine (1975)
Medium 17	48 h	42 Terzaghi and Sandine (1975)
Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF)	24 h	37 De Buyser et al. (2003)
Slanetz Bartley (SB)	48 h	42 Slanetz and Bartley (1957)
Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)	from 3 to 4 days	25 FIL-IDF 94B (1991)
Cephalidine Fucidine Cetramidine (CFC)	from 48 to 72 h	25 NF V 04-504 (1988)
Facultatively Heterofermentative (FH)	72 h	30 Isolini et al. (1990)
Turner (T)	72 h	30 Turner et al. (1963)
Turner + nalidixic acid (T + n.a.)	72 h	30 Turner et al. (1963)
Plate Count Agar + Milk (PCA + M)	3 days	30 FIL-IDF 100B
PCA + M + Gram-positive inhibitory	3 days	30 FIL-IDF 100B
Nickels and Leesment (NL)	72 h	25 Vogensen et al. (1987)
Mayeux Sandine Elliker (MSE)	72 h	30 Mayeux et al. (1962)
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	5 and 10 days	25 Denis et al. (2001)
Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar	24 h	42 NF V 08-021 (1985)

All the media were incubated aerobically except the FH medium which was incubated anaerobically.

Tris base, 89 mM borate, 2 mM EDTA) containing 5% ethidium bromide. DNA bands were visualised under UV light.

#### 2.4. SSCP capillary electrophoresis

PCR products were purified with a Strata Prep<sup>TM</sup>PCR purification Kit (Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, Netherlands) following the manufacturer's recommendations.

A mixture containing 18.75 µl deionised formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0.25 µl internal DNA molecular weight standard Genescan 400 HD Rox (Applied Biosystems, Foster City, USA) and 1 µl purified PCR product was denatured for 5 min at 95 °C and immediately cooled on ice. The mixture was then electrophoresed by SSCP capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) as described by Duthoit et al. (2003).

#### 2.5. Assignment of dominant peaks

Dominant peaks in the SSCP patterns were assigned by comparing their migration with the migration of cloned 16S rRNA gene sequences, or reference strains, or bacterial strains isolated from Saint-Nectaire cheese, or bacterial strains isolated from retentate raw-milk F5.

A clone library was prepared using genomic DNA extracted from the cheese sample showing the highest number of peaks on its SSCP profile. The 16S rRNA gene was amplified with universal primers w02 and w18. In a total volume of 50 µl, the PCR mixture contained 10 mM Tris HCl (pH 8.5), 25 mM KCl, 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 µM of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1 U of Pwo polymerase (Roche, Applied Science Division, Meylan Cedex, France) and 2 µl of extracted DNA. Amplification was performed as indicated in Table 1.

The amplified product was cloned into pCR-Blunt-II-TOPO vector and transformed in *Escherichia coli* cells following the manufacturer's instructions (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise Cedex, France). Plasmid inserts of 94 clones were amplified by PCR with M13 forward and M13 reverse

Table 3

List of microbial species assigned on the basis of over 98% similarity between their partial 16S rRNA sequences and those in databases (NCBI databases using the BLAST program)

Bacteria	ni		
<i>Lactococcus lactis</i>	10	Lactic bacteria	↑
<i>Lactococcus garvieae</i>	7		
<i>Enterococcus faecalis</i>	20		
<i>Enterococcus saccharominimus</i>	8		
<i>Enterococcus malodoratus</i>	1		
<i>Enterococcus hirae</i>	1		
<i>Lactobacillus casei</i>	1		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2		
<i>Lactobacillus farciminis</i>	2		
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	2		
<i>Lactobacillus paracase</i>	3		
<i>Lactobacillus curvatus</i>	4		
<i>Leuconostoc citreum</i>	4	Gram-positive bacteria	↑
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1		
<i>Staphylococcus aureus</i>	9		
<i>Staphylococcus xylosus</i>	4		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1		
<i>Staphylococcus equorum</i>	3		
<i>Staphylococcus xylosus</i> or <i>Staphylococcus equorum</i>	1		
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	1		
<i>Microbacterium</i> sp.	1		
<i>Corynebacterium flavescens</i>	1		
<i>Corynebacterium casei</i>	1		
<i>Brevibacterium linens</i>	1		
<i>Rothia</i> sp.	1		
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	1		
<i>Brachybacterium rhamnosus</i>	1		
<i>Brachybacterium alimentarium</i>	1		
<i>Kocuria</i> sp.	3		
<i>Kocuria rhizophilia</i>	1		
<i>Exiguobacterium</i> sp.	2		
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	Gram-negative bacteria	↑
<i>Pseudomonas unsongensis</i>	1		
<i>Pseudomonas putida</i>	16		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2		
<i>Enterobacter amnigenus</i>	14		
<i>Enterobacter</i> sp.	3		
<i>Chryseobacterium</i> sp.	7		
<i>Comamonas testoteroni</i>	1		
<i>Acinetobacterium</i> sp.	2		

ni: number of isolates.





primers. The 16S rRNA gene clones were sequenced with primer w34 on an ABI prism 310 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) using the Big Dye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Each sequence (approximately 300 bp) was compared with sequences in the GenBank database, using the NCBI BLAST program.

## 2.6. Statistical analysis

The proportion of peaks present in the SSCP profiles obtained with each primer was calculated using the following formula:  $P_i = a_i * 100 / \sum a_i$ , where  $P_i$  was the ratio of peaks and  $a_i$  the area of one peak.

The relationship between the  $P_i$  values in the (V2F–V2R)–SSCP profiles of cheeses on day 8 was shown as a dendrogram constructed by the Unweighted Pair Group Method using Average (UPGMA) with statistical software (StatSoft 2003, Statistica version 6.1, Tulsa, USA).

Principal Component Analyses (PCA) were carried out with the  $P_i$  values in the (Gram1F–Gram2R)–SSCP profiles of cheeses on day 8 using statistical software (StatSoft 2003, Statistica version 6.1, Tulsa, USA).

## 2.7. Anti-Listeria activity assessment by the agar-well diffusion method

The anti-*Listeria* activity of the raw-milk microbial community expressing the strongest *Listeria*-inhibiting potential in cheese according to Millet et al. (2006) was assessed. The raw milk was then microfiltered on an MFS-1 microfiltration pilot plant with a capacity of 600 l/h (Alpha-Laval, Les Clayes-sous-Bois, France) and the composition of the microbial retentate (raw-milk microbial fraction trapped in a 1.2- $\mu$ m pore membrane), which is representative of milk microbial community, was analysed. The various microbial populations composing the retentate were cultured in duplicate on 15 types of media (Table 2). All colonies grown on each nutrient agar medium were collected in a 5% solution of sterile glycerol and stored at  $-20^\circ\text{C}$  to be tested for their anti-*Listeria* activity as described below.

Ten to twelve colonies were also randomly picked from each duplicate culture agar medium, for identification. A total of 143 isolates were identified by sequencing approximately 300 bp of the 5' end of the 16S rRNA gene (as described above) and comparing each sequence with sequences in GenBank using the NCBI BLAST program.

The whole colonies collected on different agar media and the isolates were each grown individually for 24 h in an appropriate broth medium and at a suitable incubation temperature. Culture broths were centrifuged at 5000 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . The pH of supernatants obtained was adjusted to pH 6. Supernatants were filtered on a 0.45  $\mu$ m membrane filter (Minisart Sartorius, Hannover, Germany). The anti-listerial properties of the supernatants were tested using the Tagg and McGiven (1971) agar-well diffusion method modified by the use of a double agar layer. Petri dishes were filled with 20 ml

of neutral pH nutrient agar. The top layer consisted of 10 ml of Trypticase Soja–Yeast Extract (TS–YE) agar medium previously inoculated with 0.1 ml of an 18 h-old TS–YE broth culture of *L. monocytogenes*. Holes ( $\varnothing$  6 mm) were pierced through the top agar, the wells were filled with 0.1 ml of culture filtrate and the pH was neutralised. The inoculated plates were incubated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ . The diameter of the inhibition zone was measured.

## 2.8. Anti-Listeria activity assessment in pasteurised milk cheeses

The anti-listerial activities of some species were also evaluated by making pasteurised milk cheeses. The bacterial species tested were selected on the basis of the SSCP results.

All the milks pasteurised at  $71^\circ\text{C}$  for 30 s were inoculated with the starter *Streptococcus thermophilus* at a concentration of  $10^7$  CFU/ml and *L. monocytogenes* strain S2 at 5 to 10 CFU/25 ml. Other species were then inoculated individually into the pasteurised milks as follows.

*Chryseobacterium* spp., *Enterococcus faecium* and *Enterococcus saccharominimus* were inoculated at  $10^2$  CFU/ml, *Corynebacterium* spp. at  $10^3$  CFU/ml, *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* at  $10^5$  CFU/ml. The level of inoculation was chosen according to their bacterial counts in milk F5 (Millet et al., 2006 and unpublished data). One milk was only inoculated with *S. thermophilus* to act as a control.

Prior to inoculation, all the bacteria were prepared as described above (see above, Anti-*Listeria* activity assessment by the agar-well diffusion method).

For each set of experiment, seven batches of cheeses were made with milks inoculated in this way, according to Saint-Nectaire type technology.

After one day of ripening, the cheeses were coated with an orange wax containing 1000 ppm of natamycin (Coquard, Villefranche sur Saône, France).

All cheeses were ripened for 28 days in INRA's ripening cellars under identical conditions, at  $10^\circ\text{C}$  with 95% relative humidity.

The experiment was performed twice over a two-week period.

## 2.9. Sampling and pH determination of pasteurised milk cheeses

The cheeses were sampled for microbial and chemical analysis on days 1, 8, 18 and 28. For each cheese sample, pH was measured with a 926 VTV pH-meter with Ingold electrode 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France). Cheese samples were prepared as described by Millet et al. (2006).

## 2.10. Enumeration of bacteria in pasteurised milk cheeses

*L. monocytogenes* concentrations were determined on PALCAM media. The genus and species of five presumed *Listeria* colonies were then confirmed according to norm ISO 11290-2.

Populations of *S. thermophilus* were enumerated on M17, *Chryseobacterium* spp. on PCA + M + I medium (Table 2),



*E. saccharominimus* and *E. faecium* on SB medium, *Corynebacterium flavescentis* on CRBM medium, *L. garvieae* and *L. lactis* on T + a.n. medium in the incubation conditions indicated in Table 2.

### 2.11. Calculation of area of inhibition

In order to easily quantify the differences in *L. monocytogenes* population between treatment and control throughout ripening, the area of inhibition (AI) between two days (t1 and t2) of ripening was calculated using the formula of Wenzel and Marth (1990):

$$AI = (t_2 - t_1) / 2 \times [(C_{t_2} + C_{t_1}) - (T_{t_2} + T_{t_1})]$$

where

- C* count of *L. monocytogenes* in control cheese inoculated with *S. thermophilus*  
*T* count of *L. monocytogenes* in trial cheese inoculated with *S. thermophilus* and other bacterial species.

## 3. Results

### 3.1. Identification of isolates and the production of anti-*Listeria* compounds by the raw-milk microbial community expressing the strongest *Listeria*-inhibiting potential in cheese

One hundred and forty-three isolates were assigned to a species, based on a 98% similarity between their partial 16S rRNA gene sequences and those in the databases (NCBI databases using the BLAST program) (Table 3). Ninety-five isolates were identified as Gram-positive bacteria (63 lactic and 32 non-lactic bacteria), 48 as Gram-negative bacteria. The 143 isolates were classified into 41 microbial species.

With the agar-well diffusion method we used, none of the tests, either with individual isolates or with the retentate or with microbial populations collected on 15 agar media, produced any *L. monocytogenes*-inhibiting compound.

### 3.2. SSCP patterns obtained with w34–w49 primers amplifying the V3 region of the 16S rRNA gene

The various cheeses, prepared with three sets of experiments with each type of 6 different milks (F1 to F6), were analysed with primer pair w34–w49 on day 8. The V3 region of the 16S rRNA gene of 16 cheeses was amplified. Comparison of the SSCP patterns obtained with these primers revealed a dominant peak, named A ( $P_A > 30\%$ ), in all SSCP profiles regardless of the cheese-making batch studied. As peak A was dominant and present in all SSCP patterns, it hampered the distinction of other, subdominant peaks that might have been useful for distinguishing between the different cheeses' bacterial communities (data not shown). The dominant peak corresponded to the *S. thermophilus* isolate sequence.

### 3.3. SSCP patterns obtained with V2F–V2R primers amplifying the V2 region of the 16S rRNA gene

The different cheeses prepared with three sets of experiment with each type of 6 different milks (F1 to F6) were also obtained on days 1 and 8 with the V2F–V2R primer pair (Fig. 1). As there were no marked differences in SSCP profiles between days 1 and 8 and for the reasons explained in the Materials and methods section above, only SSCP profiles on day 8 were analysed. All the 8-day cheeses were classified in a dendrogram according to the SSCP pattern peak ratios obtained after amplifying the V2 region of the 16S rRNA gene (Fig. 2). The cheeses with the highest *L. monocytogenes* counts were clustered in 5 groups defined at an aggregative distance of 42: two cheeses prepared in two experiments from F2 and F3 were in group V and two cheeses from F1 were in group III. However, some F1, F2, F3 cheeses manufactured in the different experiments were in groups II or IV, indicating some variation in bacterial community composition from one cheese-making day to another. In contrast, cheeses with low *L. monocytogenes* counts ( $< 2.31$  CFU/g) were clustered in group I (F4, F5 and F6 cheeses from all three experiments). This clustering shows that the balance between the different populations in the bacterial communities of these cheeses, as amplified by the V2F–V2R primer pair, was stable from one cheese-making day to another.

Peak F was the dominant peak in the SSCP profiles of cheeses clustering in groups II and IV, but was proportionately smaller in the SSCP profiles of group I, III and V cheeses. There was no peak clearly characteristic of the cheeses with the highest *L. monocytogenes* counts. The cheeses in group I were distinctive in that peaks C, G and D were dominant in their SSCP profiles, whereas these peaks were absent or subdominant in the SSCP profiles of cheeses in groups II to V.

Twenty-two clones were analysed to identify the peaks with the highest ratios in their SSCP profiles. Considering only 16S rDNA sequences with at least 98% similarity with database sequences, 52% of clones were identified as *S. thermophilus*, 27% as *L. lactis*, 3% as *Streptococcus parauberis* and 14% as *Streptococcus* sp. As diversity was greater with isolate identification, the peaks were also assigned by comparing their migrations with those of the nucleotide sequences of the bacterial isolates and reference strains.

Peak F, whose ratios were among the highest in all SSCP patterns, comigrated with nucleotide sequences of *S. thermophilus* clones and isolates. Peak C comigrated with isolate sequences identified as *E. faecium* and *E. saccharominimus*, and peak G with *Chryseobacterium* sp. and *C. flavescentis* isolate sequences. Similarly, peak D coeluted with nucleotide sequences of *L. garvieae* isolate and also with nucleotide sequences of clones and isolates of *L. lactis*.

### 3.4. Evaluation of anti-*Listeria* activity in pasteurised milk cheeses

The fact that peaks C, D and G have the highest ratios on SSCP profiles of cheeses with the lowest *L. monocytogenes* counts suggests that the bacterial species corresponding to



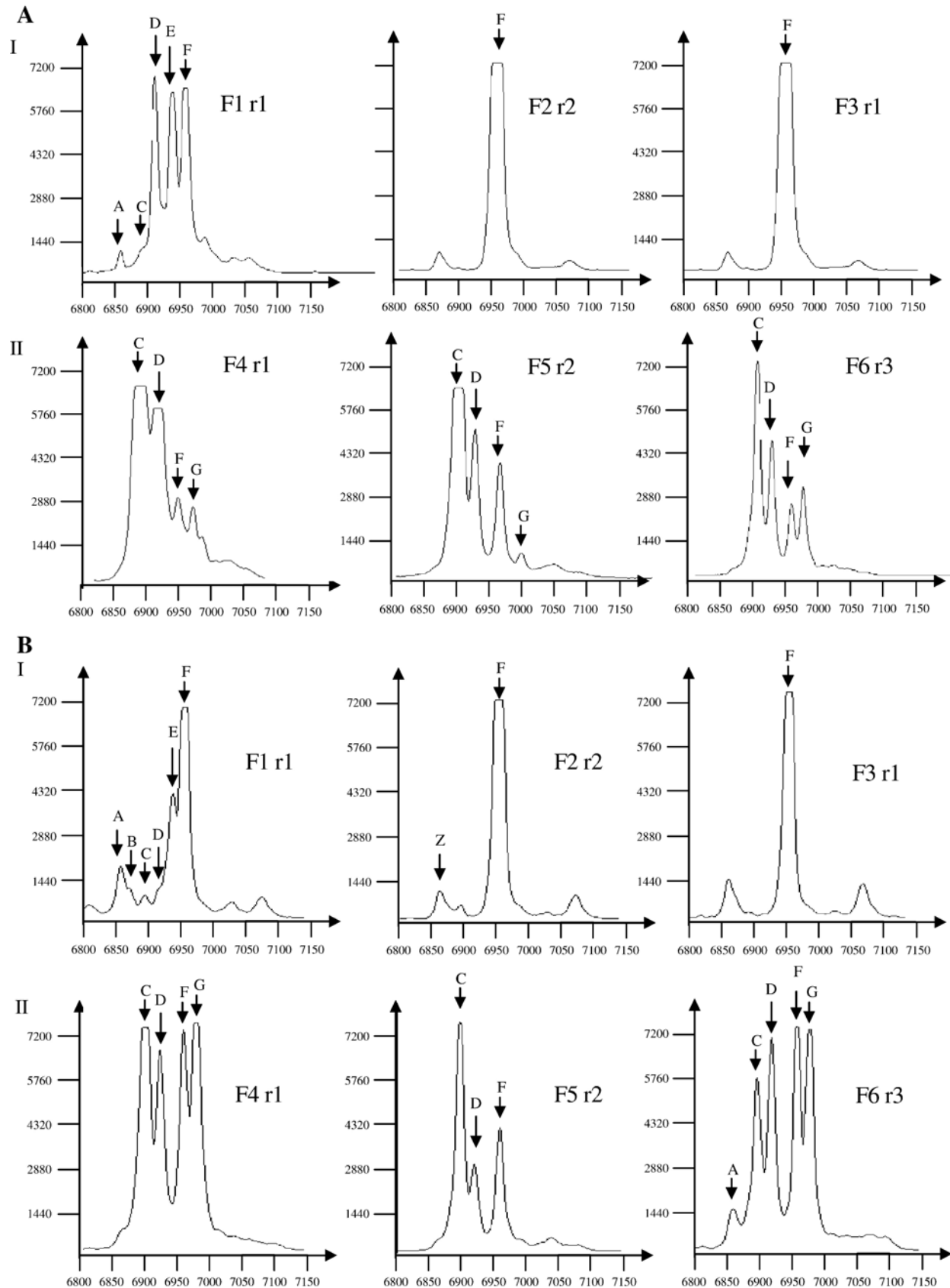


Fig. 1. Example of V2 SSCP patterns of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments from bacterial communities of raw-milk cheeses on day 1 (A) and on day 8 (B) with highest counts in *L. monocytogenes* (I) and with lowest counts in *L. monocytogenes* (II). y axis, fluorescence; x axis, elution in scans (unit of Genescan software). Fi (*i* from 1 to 6): origin farm of cheeses. rj (*j* from 1 to 3): experiment. Letters from A to G: name of peaks.



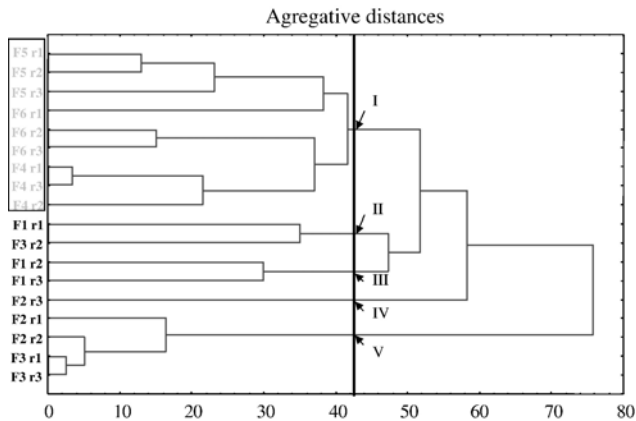


Fig. 2. Dendrogram of the distances (unweighted pair group average, Euclidean distances) between cheeses on day 8 of ripening. Classification of cheeses from the peak ratio data of their SSCP patterns of V2 region amplified 16S rRNA gene. Peak ratio data were calculated using the following formula:  $P_i = a_i / \sum a_i$ , where  $P_i$  was the ratio of peaks and  $a_i$  the area of one peak.  $F_i$  ( $i$  from 1 to 6): origin farm of cheeses;  $r_j$  ( $j$  from 1 to 3): experiment.  $F_i r_j$  framed and coloured in grey correspond to the name given to cheeses on day 8 with the lowest counts in *L. monocytogenes*.

these sequences may be involved in *L. monocytogenes* inhibition. To verify this hypothesis, the ability of *E. faecium*, *E. saccharominimus*, *Chryseobacterium* sp., *C. flavescentis*, *L. garvieae* and *L. lactis* to inhibit *L. monocytogenes* was evaluated in pasteurised milk cheeses. Cheeses made from milk inoculated with *S. thermophilus*, the species that was dominant in cheeses with high *L. monocytogenes* counts, acted as a control. *L. monocytogenes*, *S. thermophilus* and all other bacteria in the cheeses were enumerated (Table 4). All the bacterial species developed mainly during the first day. After day 1, their counts remained more or less stable. The highest counts were observed for *L. garvieae* and *L. lactis* and the lowest for *E. faecalis*. *E. saccharominimus* was not detected under our counting conditions. Between days 18 and 28, *C. flavescentis* showed weaker growth when inoculated in the mixture of 6 bacterial strains than when inoculated alone.

The development of *L. monocytogenes* was evaluated by calculating Area of Inhibition (AI) values as described in the Materials and methods section. The AI data and pH values are shown in Table 5. The higher the AI values, the stronger the inhibition of *L. monocytogenes*.

At day 1, AI values were not significantly different. After day 1, *L. monocytogenes* developed differently depending on the bacterial inoculation.

Throughout the ripening, *L. monocytogenes* AI values were the lowest in trial cheeses manufactured with *Chryseobacterium* sp. and *E. faecium*. After day 18, *L. monocytogenes* was not inhibited in presence of *E. faecium* (AI < 0).

Between days 1 and 8, AI values were significantly the highest in cheeses manufactured with *L. lactis*. Between days 8 and 18, *L. monocytogenes* was most inhibited (AI values highest) in presence of *L. garvieae* and the mixture of the 6 bacterial strains.

On days 1, 8 and 28, the pH values of the cheeses did not differ significantly. On day 18, the pH value was significantly lowest in the control cheese, whose *L. monocytogenes* count was among the highest.

#### 4. Discussion

The SSCP technique was successfully used for monitoring microbial community dynamics in cheeses (Duthoit et al., 2003). This study revealed that SSCP after DNA amplification with the proper primer set can also be an effective tool for distinguishing between cheese bacterial communities. The dominance of one peak on the SSCP profiles resulting from amplification of the V3 region of the 16S rRNA gene shows one of the limitations of the direct molecular approach when analysing bacterial communities in which one species is dominant. In the Saint-Nectaire cheeses studied, *S. thermophilus* was dominant since it is routinely used as a starter culture for Saint-Nectaire cheese. Amplification of the V2 region of the 16S rRNA gene proved more relevant for distinguishing the bacterial communities of the different cheeses and for forming a hypothesis on the bacterial flora involved in the inhibition of *L. monocytogenes*. The only feature common to the cheeses with the highest *L. monocytogenes* counts was the peak assigned to *S. thermophilus*. Their SSCP profiles had no other common characteristics. By contrast, all the cheeses with the lowest *L. monocytogenes* counts on day 8 were characterised by the dominance of 3 peaks whose nucleotide sequences comigrated with *E. faecium* and *E. saccharominimus*, *Chryseobacterium* spp. and *C. flavescentis* and *L. garvieae* and *L. lactis* sequences respectively. By inoculating these species in pasteurised milk with *L. monocytogenes*, it was shown that not all of them were able to inhibit it in cheeses prepared with these milks. *Chryseobacterium* spp. and *E. faecium* may not be involved in the inhibition under our experimental conditions. Inhibition occurred when *L. lactis* and *L. garvieae* were inoculated and, to a lesser extent, when *E. saccharominimus* and *C. flavescentis* were inoculated. According to the literature, *L. lactis* can inhibit *L. monocytogenes* (1) by producing bacteriocins such as nisin and pediocin (Olasupo et al., 1999; Rodriguez et al., 2005), (2) by producing organic acids (Wenzel and Marth, 1990; Hicks and Lund, 1991) and (3) by lowering pH values as observed by Pitt et al. (2000) in pasteurised milk. However, our results reveal that *L. monocytogenes* inhibition was not due to a decrease of pH alone, nor to the ability of strains to produce anti-listerial compounds. Lowering pH values below 5.2 was not a sufficient condition to inhibit *L. monocytogenes*, although this value has been considered important for controlling *L. monocytogenes* in raw-milk Saint-Nectaire cheeses (Millet et al., 2006). A number of studies have found it difficult to identify the compounds involved in the inhibition of *L. monocytogenes* in cheeses. Maoz et al. (2003) failed to understand why *L. monocytogenes* was inhibited on cheese surfaces as the different microbial isolates of the inhibitory consortium exhibited no anti-listerial activity. Gay and Amgar (2005) suggest that the microbial community had some role in explaining why *L. monocytogenes* developed less in raw-milk cheeses than in pasteurised milk cheeses but they did not study the nature of the inhibition (pH, organic acids, bacteriocins, etc.).





Table 4  
Bacterial counts (log CFU/ml) in control and trial cheeses on days 1, 8, 18 and 28

Trial	D	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>	Mean	S	Mean	S	Mean	S
Control	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
Control	1	2.27	9.02	0.38	0.12				
Control	8	2.90	9.09	0.14	0.05				
Control	18	2.83	9.12	0.18	0.08				
Control	28	3.01	9.08	1.07	0.01				
<i>Chryseobacterium</i> sp.		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
<i>Chryseobacterium</i> sp.	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
<i>Chryseobacterium</i> sp.	1	1.97	9.04	0.10	0.08				
<i>Chryseobacterium</i> sp.	8	2.58	9.20	0.16	0.11				
<i>Chryseobacterium</i> sp.	18	2.39	9.09	0.39	0.01				
<i>Chryseobacterium</i> sp.	28	3.30	9.04	0.88	0.02				
<i>E. saccharominimus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
<i>E. saccharominimus</i>	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
<i>E. saccharominimus</i>	1	2.04	9.11	0.27	0.16				
<i>E. saccharominimus</i>	8	2.27	9.19	0.38	0.06				
<i>E. saccharominimus</i>	18	2.60	9.13	0.09	0.07				
<i>E. saccharominimus</i>	28	1.39	9.06	0.55	0.03				
<i>E. faecium</i>		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
<i>E. faecium</i>	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
<i>E. faecium</i>	1	1.60	9.08	0.00	0.18				
<i>E. faecium</i>	8	2.77	9.22	0.03	0.06				
<i>E. faecium</i>	18	3.40	9.07	0.40	0.01				
<i>E. faecium</i>	28	3.00	9.07	0.74	0.03				
<i>C. flavesceus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
<i>C. flavesceus</i>	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
<i>C. flavesceus</i>	1	2.01	9.09	0.23	0.22				
<i>C. flavesceus</i>	8	2.63	9.15	0.12	0.18				
<i>C. flavesceus</i>	18	2.09	9.16	0.68	0.07				
<i>C. flavesceus</i>	28	2.19	9.01	0.06	0.05				
<i>L. garvieae</i>		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
<i>L. garvieae</i>	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
<i>L. garvieae</i>	1	1.83	9.16	0.49	0.08				
<i>L. garvieae</i>	8	1.39	9.24	0.55	0.13				
<i>L. garvieae</i>	18	1.90	9.10	0.08	0.04				
<i>L. garvieae</i>	28	1.94	9.17	0.65	0.14				
<i>L. lactis</i>		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
<i>L. lactis</i>	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
<i>L. lactis</i>	1	1.00	9.26	0.00	0.04				
<i>L. lactis</i>	8	1.68	9.27	0.96	0.00				
<i>L. lactis</i>	18	1.65	9.17	0.07	0.12				
<i>L. lactis</i>	28	1.42	9.16	0.60	0.16				
Mixture		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. thermophilus</i>						
Mixture	0	0.60	7.00	0.00	0.00				
Mixture	1	1.30	9.26	0.43	0.03				
Mixture	8	1.80	9.28	0.45	0.02				
Mixture	18	1.15	9.29	0.21	0.12				
Mixture	28	1.00	9.23	0.00	0.10				

All cheeses were manufactured with pasteurised milk inoculated with *S. thermophilus* and *L. monocytogenes*.

Values are the mean of 2 experiments, D: day, ±S: Standard deviation, ND: not detected.

Control: no inoculation of other bacteria, Trial: inoculation with single bacterium, Mixture: inoculation with 6 bacterial species.

*L. Listeria*, *S. Streptococcus*, *L. Lactococcus*, *E. Enterococcus*, *C. Corynebacterium*.



Table 5  
AI and pH values in pasteurised milk cheeses

Trial	AI (1–0)	AI (8–1)	AI (18–8)	AI (28–18)
<i>Chryseobacterium</i> sp.	0.15	2.94 ab	3.81 ab	0.78 ab
<i>E. saccharominimus</i>	0.12	2.09 a	5.61 ab	11.92 ab
<i>E. faecium</i>	0.33	2.78 a	2.23 a	–2.78 a
<i>Corynebacterium flavescens</i>	0.13	3.76 ab	3.76 ab	5.18 ab
<i>L. garvieae</i>	0.22	6.85 ab	12.19 b	10.01 ab
<i>L. lactis</i>	0.64	8.72 b	11.97 b	13.83 ab
Mixture	0.49	7.26 ab	13.9 b	18.45 b
<i>p</i>	NS	**	**	**

Trial	pH 1	pH 8	pH 18	pH 28
Control	5.51	5.36	5.17 a	5.34
<i>Chryseobacterium</i> sp.	5.50	5.37	5.24 ab	5.31
<i>E. saccharominimus</i>	5.46	5.33	5.24 ab	5.33
<i>E. faecium</i>	5.52	5.36	5.24 ab	5.30
<i>Corynebacterium flavescens</i>	5.52	5.35	5.26 b	5.37
<i>L. garvieae</i>	5.45	5.33	5.21 ab	5.28
<i>L. lactis</i>	5.34	5.24	5.20 ab	5.30
Mixture	5.32	5.25	5.21 ab	5.23
<i>p</i>	NS	NS	*	NS

All cheeses were manufactured with pasteurised milk inoculated with *S. thermophilus* and *L. monocytogenes*.

Control: no inoculation of other bacteria, Trial: inoculation with single bacterium, Mixture: inoculation with 6 bacterial species.

The values are the mean of 2 experiments. In the same column, letters (a, b and c) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b and c are classified in increasing order (a < b < c). Means in the same column with different letters were significantly different according to Newman–Keuls statistical test. *p* = the significance levels (NS = non-significant, \* = *p* < 0.05, \*\* = *p* < 0.01).

AI: area of inhibition.

$$AI = (t_2 - t_1) / 2 \times [(C_{t_2} + C_{t_1}) - (T_{t_2} + T_{t_1})]$$

where *C* = count of *L. monocytogenes* in control cheese inoculated with *S. thermophilus* and *T* = count of *L. monocytogenes* in trial cheese inoculated with *S. thermophilus* and other bacterial species.

*t*<sub>1</sub> and *t*<sub>2</sub> = two days of ripening. AI(*t*<sub>2</sub>–*t*<sub>1</sub>): area of inhibition between two days of ripening.

Further studies, including more accurate determination of the anti-listerial metabolites produced, are needed to achieve a better understanding of *L. monocytogenes* in cheeses.

## Acknowledgements

The authors are indebted to ARILAIT RECHERCHES and CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière) for intellectual and financial support. They also sincerely thank Saint-Nectaire trade cheese. This work was financially supported by the AQS program of the French Ministry of Agriculture. English proofreading by Philip Rousseau-Cunningham and Harriet Colman.

## References

AFNOR, 1985. Directives générales pour le dénombrement sans revivification des Enterobacteriaceae. Technique NPP et méthode par comptage des colonies. Standard NF V 08-021. Association Française de Normalisation (AFNOR).

AFNOR, 1988. Viandes et produits à base de viande. Dénombrement des *Pseudomonas*. Standard NF V 04-054. Association Française de Normalisation (AFNOR).

Buyong, N., Kok, J., Luchansky, J.B., 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology 64, 4842–4845.

Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G., 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. International Journal of Food Microbiology 90, 83–91.

De Buyser, M.L., Lombard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, P., Lahellec, C., 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 part 1 and part 2: 1999—enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. International Journal of Food Microbiology 83, 185–194.

Delbes, C., Godon, J.J., Moletta, R., 1998. 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. Environmental Microbiology 4, 267–275.

Denis, C., Gueguen, M., Henry, E., Levert, D., 2001. New media for the enumeration of cheese surface bacteria. Lait 81, 365–379.

Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C., 2003. Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene Single Strand Conformation Polymorphism analysis. Applied and Environmental Microbiology 69, 3840–3848.

Duthoit, F., Callon, C., Tessier, L., Montel, M.-C., 2005. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in “Registered Designation of Origin” Salers cheese. International Journal of Food Microbiology 103, 259–270.

Ennahar, S., Deschamps, N., 2000. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology 88, 449–457.

Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S., 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. Journal of Applied Microbiology 96, 263–270.

Gay, M., Amgar, A., 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and soft cheese made from raw milk. Lait 85, 153–170.

Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology 63, 2802–2813.

Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A.M., Mendes da Silva, J., Hansens, T.B., Knochel, S., 2002. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 68, 756–764.

Hicks, S.J., Lund, B.M., 1991. The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. Journal of Applied Bacteriology 70, 308–314.

IDF, 1991. Milk and milk products. Microorganisms. Colony Count at 30 °C. IDF Standard 100B. International Dairy Federation.

Isolini, D., Grand, M., Glättli, H., 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung 19, 57–59.

Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S., Scherer, S., 2003. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. Applied and Environmental Microbiology 69, 1854–1857.

Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R., Richard, J., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. Lait 72, 249–263.

Maoz, A., Mayr, R., Scherer, S., 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. Applied and Environmental Microbiology 69, 4012–4018.

Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R., 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. Journal of Dairy Science 45, 655.

Millet, L., Didiene, R., Tessier, L., Montel, M.C., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses. International Journal of Food Microbiology 108, 105–114.



- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.-P., Perrin, G., 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology* 64, 217–221.
- Nunez, M., Rodriguez, J.L., Garcia, E., Gaya, P., Medina, M., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 83, 671–677.
- Ogier, J.-C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.-Y., Delacroix-Buchet, A., 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5628–5643.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H., Holzapfel, W.H., 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product [in process citation]. *International Journal of Food Microbiology* 53, 141–152.
- Pitt, W.M., Harden, T.J., Hull, R.R., 2000. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 63, 916–920.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W., 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* 81, 1810–1817.
- Rodriguez, E., Calzada, J., Arques, J.L., Rodriguez, J.M., Nunez, M., Medina, M., 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15, 51–57.
- Slanetz, L.C.W., Bartley, C.H., 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* 74, 591–596.
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21, 943.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29, 807–813.
- Turner, N., Sandine, W.E., Elliker, P.R., Day, E.A., 1963. Use of tetrazolium dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* 46, 380–385.
- Vogensen, F.K., Karst, T., Larsen, J.J., Kringelum, B., Ellekjaer, D., Nielsen, E.W., 1987. Improved direct differentiation between *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus cremoris*/*Streptococcus lactis* on agar. *Milchwissenschaft* 42, 646–648.
- Wenzel, J.M., Marth, E.H., 1990. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* in a medium with internal pH control containing *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* 73, 3357–3365.
- Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.J., 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) Single-Strand Conformation Polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2, 69–78.

	Acide lactique						
	teneurs	prod	teneurs	prod	teneurs	prod	teneurs
	1j	8-1	8j	18-8	18j	28-18	28
contrôle	7,1		7,7		8,7		8,8
<i>Chryseobacterium</i> sp.	7,3	1,8	9,7	0,9	11,5	1,1	12,8
<i>E. saccharominimus</i>	5,8	2,2	8,6	0,6	10,2	-0,2	10,2
<i>E. faecium</i>	6,8	1,0	8,4	0,1	9,4	1,7	11,3
<i>Coryne flavecens</i>	6,8	1,5	9,0	0,0	9,9	0,2	10,3
<i>Lc. garvieae</i>	6,2	3,0	9,8	-1,3	9,4	-0,2	9,4
<i>Lc. lactis</i>	8,8	3,2	12,5	-1,1	12,5	-1,1	11,5
mélange	8,4	1,6	10,6	-2,4	9,2	1,6	10,9

**Tableau 10: Teneurs en acides lactiques (mg/g) et production d'acide lactique par les souches en soustrayant l'acide lactique potentiellement produit par les souches**

E : *Enterococcus*, Coryne : *Corynebacterium*, Lc : *Lactococcus*, mélange : mélange des souches bactériennes

	AI		
	<i>L. monocytogenes</i>		
	8-1	18-8	28-18
<i>Chryseobacterium</i> sp.	1	3	7
<i>E. saccharominimus</i>	2	4	16
<i>E. faecium</i>	2	-2	-2
<i>Coryne flavecens</i>	0	3	10
<i>Lc. garvieae</i>	6	15	12
<i>Lc. lactis</i>	11	16	16
mélange	7	13	22

**Tableau 11 : Aires d'inhibition de *L. monocytogenes* (1 répétition)**

AI: aire d'inhibition

AI= (t2-t1)/2 X (Ct2+Ct1)-(Tt2+Tt1)

Où C : résultats des dénombrements dans le fromage contrôle inoculé avec *S. thermophilus*

T: résultats des dénombrements dans les fromages essais fabriqués avec différentes souches bactériennes

t1 et t2 : temps d'affinage.

E : *Enterococcus*, Coryne : *Corynebacterium*, Lc : *Lactococcus*, mélange : mélange des souches bactériennes

## **4.3.2. Résultats complémentaires : dosage des acides lactiques dans les fromages fabriqués avec différentes souches bactériennes**

### **4.3.2.1. Introduction**

En complément des travaux présentés dans l'article précédent, nous avons dosé les teneurs en acide lactique des fromages de la première répétition de ces essais. L'objectif était de confirmer leur rôle dans l'inhibition de la souche de *L. monocytogenes* S1 comme suggéré dans l'article de Millet et al. (2006).

### **4.3.2.2. Résultats**

A 1 jour, les plus fortes teneurs en acide lactique ont été dosées dans les fromages fabriqués avec *Lc. lactis* et le mélange de souches (Tableau 10). Dans ces fromages, la production d'acide lactique serait attribuée à *Lc. lactis* également présent dans le mélange. Dans les autres fromages, à l'exception du fromage dont le lait a été inoculé avec *E. saccharominimus*, les teneurs en acide lactique sont similaires à celles du fromage uniquement fabriqué avec *S. thermophilus*. L'acide lactique serait ainsi uniquement produit par *S. thermophilus* (fromage témoin) et non par les autres espèces. Par contre, dans les fromages fabriqués avec *E. saccharominimus*, les teneurs en acide lactique sont inférieures à celles du fromage témoin.

Entre 1 et 8 jours, par rapport au fromage fabriqué avec *S. thermophilus* seul, une production d'acide lactique est observée dans tous les fromages. Toutes les souches inoculées ont donc produit de l'acide lactique. Les plus fortes productions sont notées dans les fromages fabriqués avec *Lc. garvieae* et *Lc. lactis* et la plus faible dans les fromages fabriqués avec *E. faecium*.

A 1 jour, tous les fromages contiennent plus d'acide lactique que le fromage témoin. Les plus fortes teneurs ont été dosées dans les fromages fabriqués avec *Lc. lactis* et *Lc. garvieae*. Les plus fortes productions en acide lactique entre 1 et 8 jours sont observées dans les fromages fabriqués avec *Lc. lactis*, *Lc. garvieae* et le mélange des souches. Elles sont à mettre en relation avec les plus fortes inhibitions de *L. monocytogenes* (Tableau 11).

A 8 jours, les fromages dont le lait a été inoculé avec *Lc. Lactis* et les fromages fabriqués avec le mélange des souches ont des teneurs en acides supérieures à 10 mg/g. Dans les fromages fabriqués avec le mélange des souches, malgré les plus fortes teneurs en acide lactique, *L. monocytogenes* n'est que faiblement inhibée.

Entre 8 et 18 jours, l'acide lactique est consommé dans les fromages fabriqués avec *Lc. lactis* et *Lc. garvieae*. Dans les autres fromages, il n'est pas ou faiblement produit.

Entre 18 et 28 jours, l'acide lactique est uniquement produit dans les fromages fabriqués avec *Chryseo. sp*, *E. faecium* et le mélange des souches. Cette production pourrait expliquer l'inhibition de

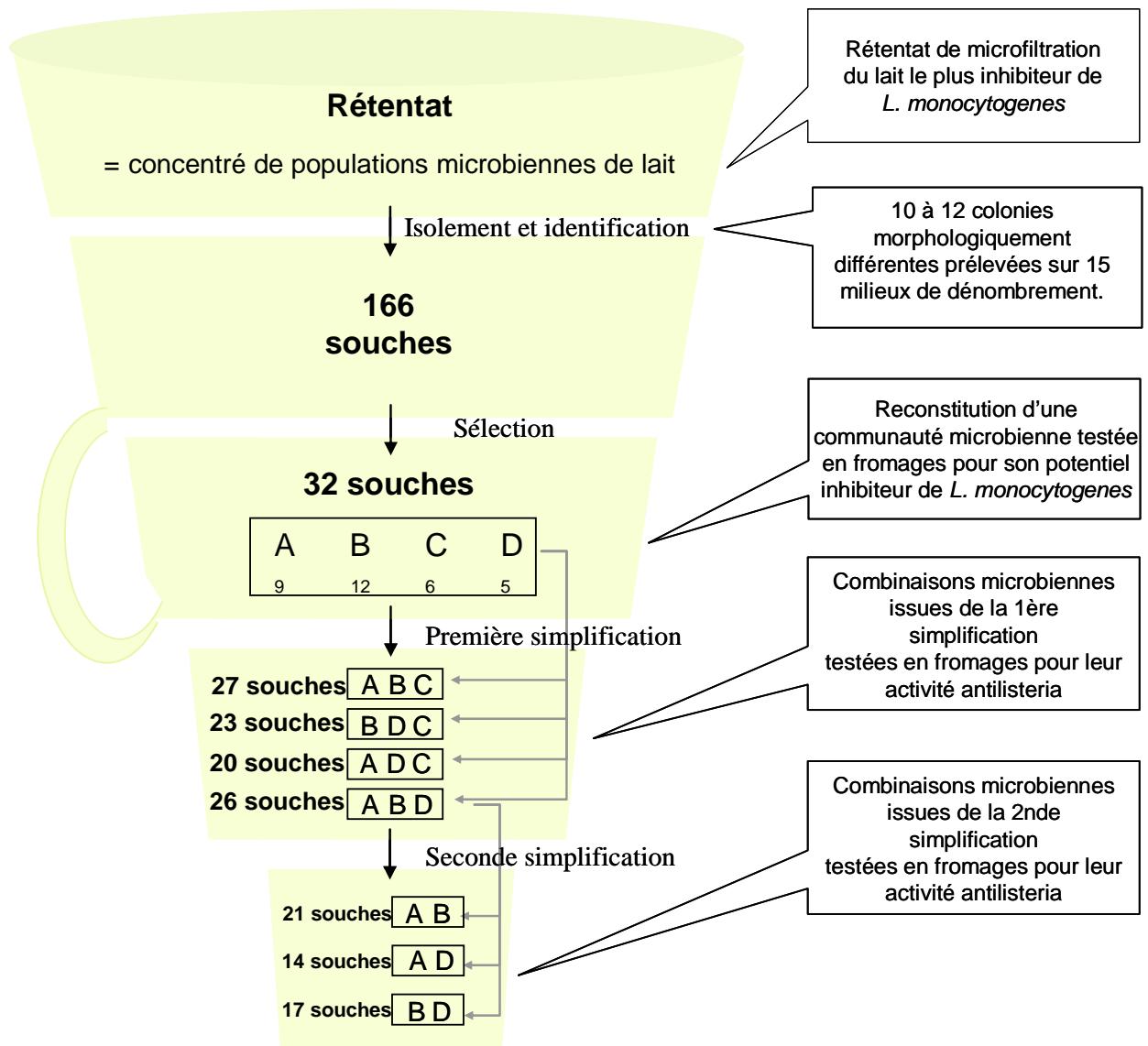




*L. monocytogenes* dans les fromages fabriqués avec le mélange des souches. Même si l'acide lactique est aussi produit par *E. faecium* et *Chryseo. sp.*, l'inhibition de *L. monocytogenes* est faible et une croissance est même observée avec *E. faecium*. *E. saccharominimus* et *Coryne. flavescens* inhibent *L. monocytogenes* entre 8 et 18 jours sans production d'acide.

#### **4.3.2.3. Conclusions**

En début d'affinage, l'acide lactique produit par *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* ainsi que le mélange des souches interviendrait dans l'inhibition à ce stade. En cours d'affinage, la production d'acide lactique par *Chryseo. sp.* ne conduit qu'à une faible inhibition de *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* se multiplie fortement dans les fromages préparés avec *E. faecium* malgré une production d'acide lactique tout au long de l'affinage. Inversement, *L. monocytogenes* est inhibée dans les fromages fabriqués avec *E. saccharominimus* sans production d'acide lactique.



**Figure 13 : Stratégie de simplification de la communauté microbienne inhibitrice de *Listeria monocytogenes***

#### **4.4. Chapitre 4 : Effet des communautés microbiennes de composition plus ou moins complexe sur la croissance de *L. monocytogenes*.**

##### **4.4.1. Préambule**

Dans la publication du chapitre 3, il a été montré que les populations de *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Coryne. flavescentis* et *E. saccharominimus* étaient capables d'inhiber *L. monocytogenes* en fromages. L'objectif de cette partie était de déterminer si d'autres populations microbiennes identifiées dans la communauté inhibitrice (Saubusse et al., 2007) pourraient faire barrière à *L. monocytogenes* et si oui comment elles agiraient dans un fromage type Saint-Nectaire.

Une approche d'omission successive des grands groupes microbiens a été choisie pour atteindre ces objectifs.

La communauté de base a été définie en se basant sur les travaux présentés dans les articles de Millet et al. (2006) et de Saubusse et al. (2007) des chapitres 1 et 3. Ainsi, sur 166 isolats identifiés dans la communauté microbienne d'un fromage dans lequel *L. monocytogenes* ne se développe pas, les souches appartenant à 32 espèces les plus fréquemment isolées dans les fromages de type Saint-Nectaire (données du laboratoire) ont été sélectionnées.

La communauté de base comprend ainsi 32 espèces réparties en 4 groupes comme il est indiqué dans le tableau 3 du Matériel et Méthodes :

- le groupe des bactéries lactiques<sup>6</sup> ou groupe A constitué par 9 espèces
- le groupe des bactéries non lactiques à Gram positif ou groupe B comprend 12 espèces
- le groupe des bactéries à Gram négatif ou groupe C constitué par 6 espèces
- le groupe des levures ou groupe D constitué par 5 espèces.

Dans une première série d'expériences, à partir de la communauté de base, 4 communautés microbiennes ont été constituées par omission d'un des groupes microbiens comme indiqué dans la figure 13. Ces communautés ont été inoculées dans du lait pour la fabrication de fromages de type Saint-Nectaire (paragraphe 3.1.5 Matériel et Méthodes). Les résultats d'évolution des populations microbiennes, de composition en acides et composés volatils de cette première série d'essais sont présentés ci-dessous.

##### **4.4.2. Résultats de la première série d'expérimentations**

###### **4.4.2.1. Développement des populations microbiennes**

---

<sup>6</sup> La dénomination bactéries lactiques sera adoptée dans la rédaction pour désigner le groupe des bactéries lactiques inoculées autres que *S. thermophilus*

espèces inoculées	FH	SB	MSE	RPF	CRBM	VRBG	PCA+ L+I	OGA
<i>Lactobacillus casei</i> (2)	Xb		x <sub>p</sub>					
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Xb		x <sub>p</sub>					
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Xb		x <sub>p</sub>					
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Xb		x <sub>p</sub>					
<i>Leuconostoc citreum</i>			XD+				X	
<i>Ln pseudomesenteroides</i>			XD+		X			
<i>Enterococcus faecalis</i>		Xr	x <sub>p</sub>		Xb		X	
<i>Enterococcus hirae</i>		Xr	x <sub>p</sub>		Xb		X	
<i>Staphylococcus xylosus</i>		Xr	xb	Xg	Xj	x		
<i>Staphylococcus equorum</i>				Xg	Xbc	X		
<i>Arthrobacter nicotianae</i>				Xm	X		Xj	
<i>Microbacterium sp.</i>				Xm	X			
<i>Corynebacterium flavesces</i>				Xg	Xj			
<i>Corynebacterium casei</i>				Xg	Xb			
<i>Brevibacterium linens</i>				X	Xo			
<i>Exiguobacterium sp.</i>				X	Xo			
<i>Kocuria rhizophilia</i>				X	Xj			
<i>Brachybacterium rhamnosum</i>				X	Xb	x		
<i>Rothia sp.</i>				X	Xo			
<i>Macrococcus caseolyticus</i>				X	Xo			
<i>Pseudomonas putida</i>						X	Xvj	
<i>Enterobacter amnigenus</i>					Xj	X	Xvg	
<i>Commamonas testosteroni</i>							Xvg	
<i>Chryseobacterium sp</i>							Xo	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				X	Xj	X	Xo	
<i>Rhodosp. babjevae/Rhodu. graminis</i>								Xro
<i>Debaromyces hansenii</i>								Xbm
<i>Candida pseudointermedia</i>								Xbb
<i>Candida pararugosa</i>								Xbr
<i>Yarrowia lipolytica</i>								Xbb

**Tableau 12 : Capacité des souches à se multiplier sur les différents milieux dans les conditions d'incubation définies dans le chapitre 3.2.2.1 du matériel et méthodes.**

Xp : petites colonies ; XD+ : colonies productrices de dextranes, Xb : colonies blanches, Xbb : colonies blanc brillant, Xbc : colonies blanc crème, Xbm : blanc mate, Xbr : colonies blanches rugueuses, Xj : colonies jaunes, Xg : colonies grises, Xm : colonies marron, Xr : colonies rouges ; Xro : colonies roses, Xo : colonies oranges, Xvj : colonies violet jaune, Xvg : colonies violet grises.

A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à gram négatif ; D : levures

#### 4.4.2.1.1. Populations microbiennes autres que *L. monocytogenes*

L'évolution des grands groupes a été suivie :

- par une approche culture dépendante : quantification des flores par dénombrement et mesure des équilibres microbiens sur certains milieux par la technique de SSCP<sup>7</sup> ciblant la région V3 de l'ADNr16S,
- par une approche moléculaire culture indépendante par la technique de SSCP (amplification d'une extension de la région V2 de l'ADNr 16S) directement sur les acides nucléiques extraits des fromages.

##### 4.4.2.1.1.1. Quantification sur milieux et équilibres des populations par la technique de SSCP

La capacité des souches inoculées dans le lait à se développer sélectivement sur les différents milieux a été vérifiée comme il est indiqué sur le tableau 12.

##### 4.4.2.1.1.1.1. *S. thermophilus* et les bactéries lactiques (groupe A)

Les populations thermophiles dominées par *S. thermophilus* et quantifiées sur le milieu M17 incubé à 42°C ont un niveau similaire (9 log UFC/g) dans tous les fromages (Tableau 13).

La majorité des genres du groupe des bactéries lactiques peut être quantifiée par dénombrement sur milieux sans qu'il soit possible de quantifier spécifiquement les espèces. Comme déjà décrit dans la littérature (Callon et al 2004), le milieu FH d'Isolini et al. (1990) nous a permis de quantifier le genre *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* (2), *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus farciminis*), le milieu SB les deux espèces d'*Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. hirae*), et le milieu MSE les deux espèces de *Leuconostoc* producteurs de dextranes (*Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum*).

Les populations de bactéries lactiques constituent la flore dominante de tous les fromages dont les laits de fabrication avaient étéensemencé avec ce groupe A. Ainsi, le niveau maximal de population de *Leuconostoc* producteurs de dextranes dépassent 8 log UFC/g (soit un accroissement de 4 log UFC/g) dès 8 jours d'affinage lors de l'inoculation des 3 groupes - bactéries non lactiques à Gram positif ou groupe B, les bactéries à Gram négatif ou groupe C, les levures ou groupe D. La population maximale est atteinte après 18 jours si les groupes B ou C sont absents. Les populations de *Lactobacillus* ont été expérimentalement inoculées à 4 log UFC/g au lieu de 2,89 log UFC/g comme théoriquement prévu.

---

<sup>7</sup> Cette étude a été réalisée par Héloïse Driquet au cours duquel la méthodologie a aussi été développée, ses résultats sur les spectres SSCP des populations cultivables sont insérés dans cette thèse

Genres ou groupes	ABCD					ABD					ABC					ADC					BDC				
	ni	nd(t0)	nd(t+1h)	max	t	nd(t0)	nd(t+1h)	max	t	nd(t0)	nd(t+1h)	max	t	nd(t0)	nd(t+1h)	max	t	nd(t0)	nd(t+1h)	max	t				
Thermophiles (M17-42°C)	7,00		7,21	9,33	8		7,18	9,29	1		7,26	9,29	1		7,26	9,47	8		7,01	9,38	18				
Levures (OGA)	1,79	2,31	2,84	3,87	28	2,31	2,01	4,33	28	<1,01	<1,00			2,79	2,61	5,53	18	2,01	2,48	5,42	18				
Enterococcus(SB)	1,97	<2,00	<3,00	6,56	8	<2,00	3,01	6,97	18	3,01	3,01	6,61	8	<2,00	<3,00	6,64	18	<2,00	<3,00	<2,00					
Leuconostocs(MSE)	3,30	3,67	3,78	8,42	8	3,79	3,74	8,62	18	3,76	3,83	8,49	8	3,59	3,84	8,31	18	<1,00	<1,00	<2,00					
Lactobacillus(FH)	2,89	3,88	3,91	8,46	28	4,06	4,06	8,10	28	4,08	4,03	8,38	28	4,06	4,06	8,35	28	2,17	3,48	3,81	28				
Gram négatif (PCA+L+I)	3,71	3,79	3,51	6,28	8	<1,00	6,09			<1,00	3,70	6,74	8	3,79	3,75	6,26	8	4,00	3,79	7,17	8				
bactéries non lactiques et Enterococcus (CRBM)	2,80	<3,00	3,26	7,92	8	<3,00	3,01	7,81	8	<4,00	2,96	7,76	8	<3,00	2,48	7,18	1	<3,00	3,29	5,94	18				
Staphylococcus et Corynebacterium (RPF)	2,26	2,61	2,31	5,02	18	2,71	2,95	4,78	18	2,48	3,05	4,66	28	<1,00	<1,00	<2,00		2,61	3,01	4,81	28				

**Tableau 13: Numérations des principaux genres ou groupes microbiens sur divers milieux** (cf. tableau 12).

ni = inoculation théorique, nd(t0) : résultats des dénombrements sur les échantillons prélevés juste après ensemencement des cocktalls, nd(t+1h) : résultats des dénombrements après 1h d'incubation à 32°C et ajout du ferment ; max= niveau des populations maximal atteint, t= temps en jours pour atteindre le niveau maximal  
 Seules les bactéries thermophiles du ferment sont dénombrées dans le fromage contrôle (les bactéries à Gram négatif ont été détectées à 28 jours)  
 ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

Quels que soient les fromages, elles se multiplient tout au long de l'affinage pour atteindre un niveau maximal de 8 log UFC/g après 28 jours d'affinage. Quant aux populations d'entérocoques, leur niveau maximal de 6,9 log UFC/g, est atteint après 8 ou 18 jours. Ces 3 genres ne sont pas dénombrés dans les fromages dans lesquels ils n'ont pas étéensemencés.

#### 4.4.2.1.1.2. Les bactéries non lactiques Gram positif (groupe B)

La quantification des genres du groupe des bactéries non lactiques à Gram positif (groupe B) s'est avérée plus problématique. En effet, les deux populations de *Staphylococcus* (*Staph. equorum* et *Staph. xylosus*) et les 2 espèces du genre *Corynebacterium* (*Coryne. casei* et *Coryne. flavesceus*) sont cultivables sur le milieu RPF sans qu'il soit possible de distinguer ces deux genres dont les colonies ont un aspect similaires gris. Les populations de *Staphylococcus* (*Staph. equorum* et *Staph. xylosus*) et *Corynebacterium* (*Coryne. casei* et *Coryne. flavesceus*) se développent nettement moins que les bactéries lactiques puisque leur niveau maximum sur le milieu RPF n'est jamais supérieur à 5 log UFC/g, niveau qui peut être atteint après 18 ou 28 jours selon les fromages (Tableau 13). Elles ne sont pas dénombrées dans les fromages où elles n'ont pas été initialement inoculées dans le lait.

Toutes les bactéries à Gram positif non lactiques (Groupe B) sont capables de se multiplier sur le milieu CRBM mais la capacité des *Enterococcus* à se multiplier aussi sur ce milieu ne permet de quantifier ce groupe microbien (groupe B) que dans les fromages où les *Enterococcus* n'ont pas été inoculés.

L'analyse par SSCP de la région V3 de l'ADNr 16S des populations cultivées sur le milieu CRBM révèle en effet que le pic d'*E. faecalis*, *Ln. mesenteroides* et *Macro. caseolyticus* est majoritaire sur les profils SSCP des milieux de dénombrements des fromages ABCD, ADC et ABC à 1, 8 et 18 jours et sur celui du fromage ABC à 28 jours (Tableau 14). Par contre, sur les profils SSCP des populations cultivées sur CRBM des fromages ABD, le pic dans lequel comigrent les séquences nucléotidiques de *Coryne.casei*, *Staph. equorum* et *Staph. xylosus* est dominant à 1, 8 et 18 jours. Sur les profils SSCP des populations cultivées sur CRBM des fromages ABCD à 28 jours le pic dans lequel coéluent les séquences nucléotidiques de *Koc. rhizophilia*, *Rothia sp.*, *Arthro. nicotianae* et *Brevi. linens* (KRAB)<sup>8</sup> est majoritaire. Dans les fromages préparés sans le groupe A des bactéries lactiques (fromage BDC), les populations de bactéries non lactiques à Gram positif (groupe B), globalement quantifiées sur le milieu CRBM, ne dépassent pas 5,94 log UFC/g (accroissement de 2 log UFC/g par rapport à l'inoculation), niveau atteint après 18 jours.



Espèces	ABCD	ABC	ABD	BCD	ACD	ABCD	ABC	ABD	BCD	ACD	ABCD	ABC	ABD	BCD	ACD	ABCD	BCD	ACD
<i>Kocuria rhizophila</i> <i>Rothia</i> sp. <i>Arthrobacter nicoianae</i> <i>Brevibacterium linens</i>	35	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	17	21	19	70	21	100	5
<i>Corynebacterium flavescens</i>	0	31	0	40	0	0	0	0	0	0	0	40	0	38	0	35	0	0
<i>Brachybacterium rhamosum</i> <i>Chryseobacterium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Macrococcus caseolyticus</i>	65	69	0	0	91	100	100	0	0	96	100	43	0	0	16	44	0	35
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0	0	2	1	0	0	0	4	17	0	0	0	27	37	0	0	0	0
<i>Corynebacterium casei</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	0	0	98	38	0	0	0	96	65	0	0	0	52	6	14	0	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus farciminis</i>	0	0	0	0	9	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	60

**Tableau 14: Ratios des pics SSCP (P<sub>i</sub>) après amplification de la région V3 de l’ADNR 16S des colonies collectées sur le milieu CRBM dans les laits et les fromages à 1, 8, 18 et 28 jours**  
 $P_i = a_i \times 100 / \sum a_i$ , où P<sub>i</sub> représente la proportion de chaque pic i et a<sub>i</sub> l’aire d’un pic.  
 ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

Temps		1 jour			8 jours				18 jours				28 jours			
Espèces		ABCD	ABD	BCD	ACD	ABCD	ABC	ABD	BCD	ACD	ABCD	ABC	ABD	BCD	ACD	ABCD
Brachybacterium rhamnosum		17	13	12	10	13	6	24	9	9	100	6	14	12	16	20
Chryseobacterium sp.																
Enterococcus faecalis		19	23	26	0	17	21	0	23	0	0	10	20	21	0	24
Leuconostoc mesenteroides																0
Macrococcus caseolyticus																
Exiguobacterium sp.		57	62	62	46	61	69	68	68	89	0	42	66	67	79	53
Enterobacter amnigenus																80
Commamonas testosteroni		7	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Pseudomonas putida																0
Lactobacillus curvatus																
Leuconostoc citreum		0	2	0	44	0	4	8	0	2	0	42	0	0	5	0
Lactobacillus farciminis																8

**Tableau 15 : Ratios des pics SSCP (P<sub>i</sub>) après amplification de la région V3 de l’ADNR 16S des colonies collectées sur le milieu PCA+Lait+inhibiteur de bactéries à Gram positif dans les laits et les fromages à 1, 8, 18 et 28 jours**  
 $P_i = a_i \times 100 / \sum a_i$ , où P<sub>i</sub> représente la proportion de chaque pic i et a<sub>i</sub> l’aire d’un pic.  
 ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

L'analyse par SSCP des colonies cultivées sur le milieu CRBM des fromages BDC à différents temps d'affinage montre que les équilibres entre les diverses espèces varient au cours du temps. A 1 jour, les pics assignés à *Coryne. flavescens* d'une part et *Coryne. casei*, *Staph. xylosus* et *Staph. equorum* d'autre part dominent le profil. A 1 jour, le ratio du pic KRAB ne représente que 21% de l'ensemble des pics et le pic d'*Exiguo. sp.* et *Enterob. amnigenus* est très sous-dominant. Par contre, à 18 jours, alors que le pic d'*Exiguo. sp.* et *Enterob. amnigenus* devient dominant (37%), le ratio du pic de *Coryne. casei*, *Staph. xylosus* et *Staph. equorum* est de 6%. A 28 jours, un seul pic KRAB est détecté.

#### 4.4.2.1.1.1.3. Les bactéries à Gram négatif (groupe C)

Aucun des milieux, PCA +L+I ou VRBG ne permet de quantifier spécifiquement les différents genres de bactéries à Gram négatif (Tableau 12) car des bactéries à Gram positif non lactiques (*Staph. equorum*, *Staph. xylosus* et *Brachy. rhamnosus*) sont capables de se multiplier sur le milieu VRBG et *E. faecalis*, *E. hirae*, *Ln. citreum* ainsi qu'*Arthro. nicotianae* sur le milieu PCA+L+I. Seuls les résultats sur PCA+L+I seront présentés car ce milieu permet une meilleure croissance de *Chryseo sp.* et *Com. testosteroni* que le milieu VRBG.

Quels que soient les fromages, les populations dénombrées sur le milieu PCA+L+I atteignent leur niveau maximal à 8 jours puis ont tendance à décroître (Tableau 13).

Compte tenu du manque de sélectivité de ce milieu vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, des flores sont dénombrées sur les milieux PCA+L+I quelles que soient les combinaisons microbiennes ensemencées dans les laits.

L'analyse SSCP de la région V3 de l'ADNr 16S des populations cultivées sur ce milieu confirme son manque de sélectivité puisque le pic correspondant à *E. faecalis*, *Ln. pseudomesenteroides* ou *Macro. caseolyticus* est détecté sur la plupart des profils des colonies des milieux à 1, 8, 18 et 28 jours (Tableau 15). Néanmoins, le pic assigné à *Enterob. amnigenus* et *Exiguo sp.* est dominant dans la majorité des profils et son ratio tend à augmenter en cours d'affinage (80% dans les milieux PCA+L+I du fromage ADC à 28 jours). Vu que *Ln. pseudomesenteroides* et *Macro. caseolyticus* ne se multiplient pas sur ce milieu, il pourrait correspondre à *E. faecalis*.

Le pic correspondant à *Chryseo. sp* et *Brachy. rhamnosus* et celui de *Lb. curvatus*, *Lc. citreum* et *Lb. farciminis* sont également détectés dans la plupart des profils SSCP des colonies cultivées sur le milieu PCA+L+I, excepté sur les profils SSCP du fromage BDC. Le pic serait assignable à *Ln. citreum*, les autres espèces ne se multipliant pas sur ce milieu (Tableau 12).

Espèces selon l'aspect des colonies sur OGA													
fromages	Blanche mate <i>Debaryomyces hansenii</i>			Beige brillant <i>Candida pseudointermedia</i> et <i>Y. lipolytica</i>			Rugueuse <i>Candida pararugosa</i>			Rose <i>Rhodsporidium babjevae</i>			
	1j	8j	18j	28j	1j	8j	18j	28j	1j	8j	18j	28j	
ABC	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
ABD			4,01										
BDC			4,58		4,05			3,96	2,48	2,48	2,00	<2,00	<2,00
ADC		3,87	5,00	2,91	4,24			3,61	2,30	3,54	3,90	3,31	
ABCD		3,18	2,12	2,12			<2,00	<2,00	2,48	<2,00	5,25	<2,00	
							<2,00	3,57	3,22	2,00	<2,00	2,37	

**Tableau 16: Résultats des dénombrements des différents types de colonies sur le milieu OGA (cf. tableau 12).**

j: jours ; ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

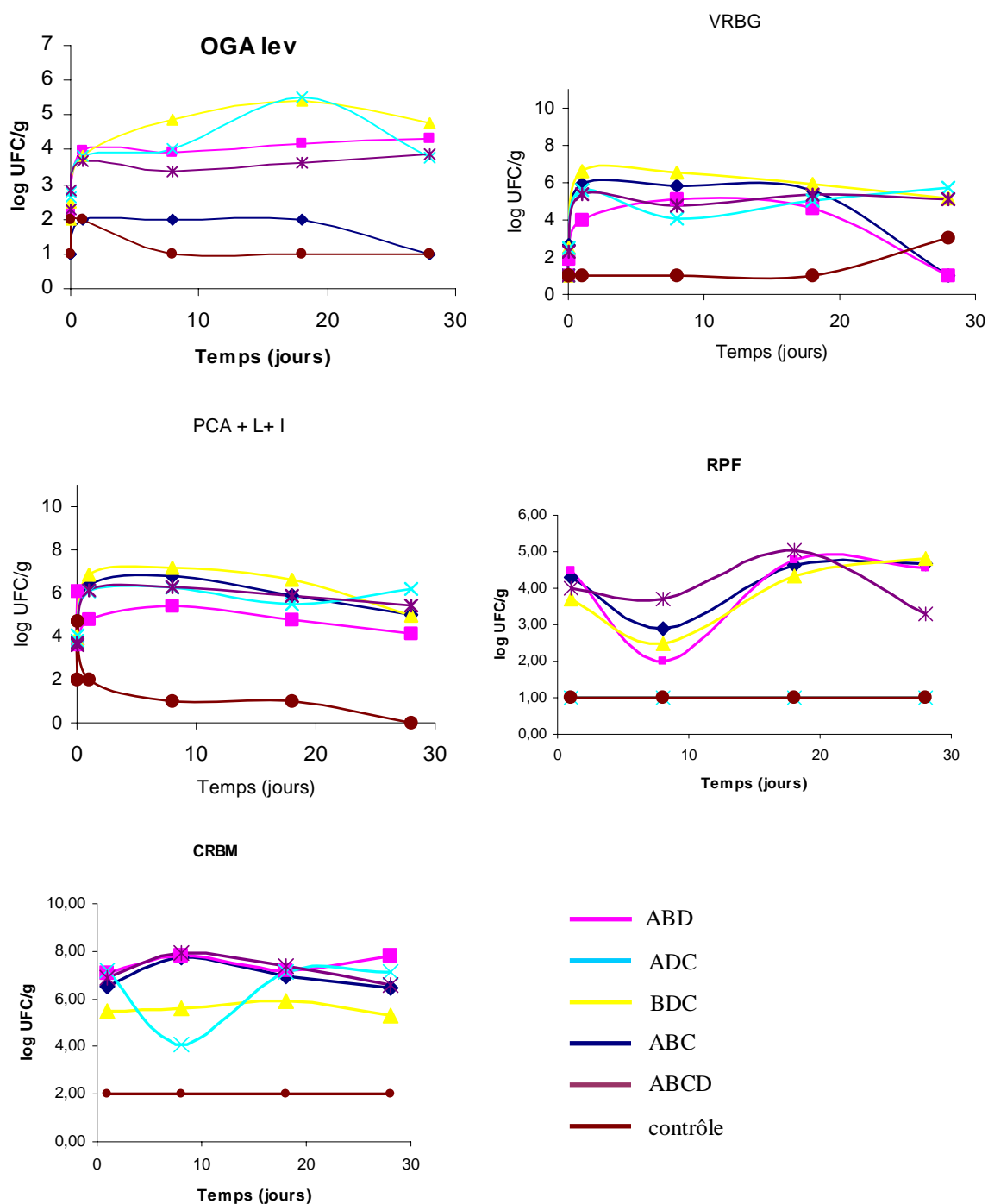
fromages	Stade de prélèvement	Analyse	<i>C. pseudointernedia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>Debarrya. hansenii</i>	<i>C. parvugosa</i>	<i>Rhodo. babjiervae</i>
ADC	8 jours	SSCP boite colonies	99 32		0 68	1 0	0 0
ADC	18 jours	SSCP colonies	96 18		4 30	0 0	0 52
ADC	28 jours	SSCP colonies	100 3		0 13	0 84	0 0
ABCD	8 jours	SSCP colonies	100 75	0	0 17	0 0	0 8
ABCD	18 jours	SSCP colonies	77 17	0	6 3	17 80	0 0
ABCD	28 jours	SSCP colonies	96 1	0	4 13	0 82	0 4

**Tableau 17: Comparaison des ratios des pics profils SSCP (Pi) des colonies collectées sur le milieu OGA et pourcentage des différents types de colonies dénombrées sur le milieu OGA (cf. tableau 12).**

$P_i = a_i \times 100 / \sum a_i$  où Pi représente la proportion de chaque pic i et  $a_i$  l'aire d'un pic. SSCP : ratios des pics des profils SSCP après amplification de l'ADNr18S des colonies collectées sur le milieu OGA ; Colonies : proportions des différents types de colonies qui se sont développées sur le milieu OGA. Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions (3 milieux OGA inocués avec la même dilution)

C : *Candida* ; *Debarryo* : *Debarryomyces* ; *Rhodo* : *Rhodospordium*

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures



**Figure 14 : Exemples d'évolution de populations microbiennes dans les fromages fabriqués avec les différentes combinaisons microbiennes**

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

Le niveau des flores sur le milieu PCA+L+I des fromages BDC préparés sans bactérie lactique (groupe A) est cependant le plus élevé (7,17 log UFC/g à 8 jours) (Tableau 13). Ces flores pourraient être identifiées à *Enterob. amnigenus* ou *Exiguu. sp.* ou *Macro. caseolyticus* ou *Chryseo. sp.* d'après l'analyse des profils SSCP de l'ensemble des colonies collectées sur ce milieu.

#### 4.4.2.1.1.4. Les levures (groupe D)

##### Quantification des levures par dénombrement sur le milieu OGA

La quantification des espèces de levures a été possible sur le milieu OGA en raison de l'aspect différent des colonies. Ainsi, les souches de *C. pseudointermedia* et *Y. lipolytica* forment des colonies d'aspect beige brillant, les colonies de *C. pararugosa* ont un aspect rugueux alors que celles de *Debaryo. hansenii* apparaissent beige mate et celles de *Rhodo. babjevae* sont roses (Tableau 16).

Les niveaux de populations de levures diffèrent d'un fromage à l'autre en fonction des groupes microbiens inoculés dans le lait. Leur développement le plus tardif et le plus faible (3,87 log UFC/g à 28 jours) est observé dans les fromages fabriqués avec la communauté microbienne la plus complexe ABCD. Il est plus rapide, dès 18 jours, et plus important (>5,42 log UFC/g) dans les fromages fabriqués soit sans le groupe des bactéries lactiques (BDC) soit dans ceux fabriqués sans le groupe des bactéries à Gram positif non lactiques (ADC). En présence de bactéries lactiques (groupe A), une diminution des niveaux de levures est notée entre 18 et 28 jours (Figure 14). Les levures ne sont pas détectées dans les fromages où elles n'ont pas étéensemencées (fromages ABC).

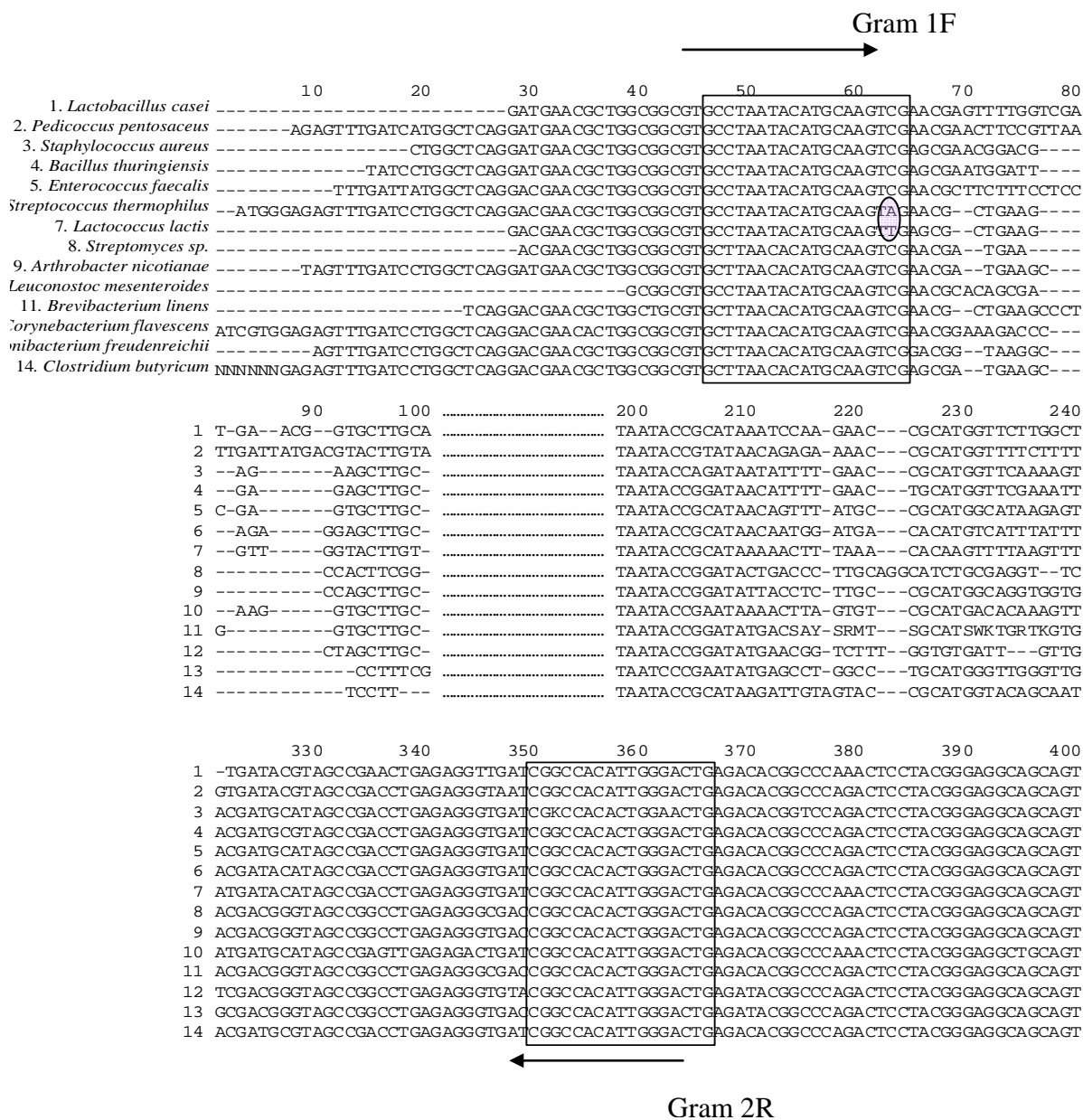
A 18 jours, dans le fromage ADC dont le niveau de levures est le plus élevé, les espèces *C. pseudointermedia* et/ou *Y. lipolytica*, *Rhodo. babjevae* et *Debaryo. hansenii* sont détectées à des niveaux voisins de 5 log UFC/g alors que l'espèce *C. pararugosa* est très sous-dominante (<2 log UFC/g).

A 28 jours d'affinage, les espèces *Debaryo. hansenii* ainsi que *C. pseudointermedia* et/ou *Y. lipolytica* dominent dans les fromages ABD et BDC alors que *C. pararugosa* domine dans les fromages ADC et ABCD (Tableau 16). A ce stade, *Rhodo. babjevae* est sous-dominante. Elle est dénombrée tout au long de l'affinage dans les fromages ne contenant pas le groupe des bactéries lactiques (Groupe A) alors qu'elle n'est que occasionnellement détectée dans les fromages fabriqués avec ce groupe.

##### Analyse SSCP de la région V4 de l'ADNr18S des colonies collectées sur le milieu OGA (Tableau 15)

Les ADNr 18S des 5 souches de levures constituant le groupe D ont tous été amplifiés avec les amorces lev1 et lev2. Les amplifiats sont séparés par analyse SSCP et aucune coélution n'est observée sur les profils.

Pour la plupart des profils SSCP de la région V4 de l'ADNr 18S de l'ensemble des colonies cultivées sur le milieu OGA correspondant aux différents fromages, un pic de *C. pseudointermedia* domine et



**Figure 15 : Alignement multiple d'ADNr 16S (clustal W) utilisé pour dessiner les amorces Gram1F- Gram2R.**

L'ADNr 16S de *S. thermophilus* et de *Lc. lactis* diffère de l'ADNr 16S des autres bactéries à Gram positif par un mismatch en avant dernière position sur le primer Gram 1F (sens 5'-3')

représente de 77 à 100% du ratio de l'ensemble des pics. Le pic de *D. hansenii* n'est détecté que sur les profils SSCP des milieux OGA des fromages ABCD après 18 ou 28 jours et du fromage ADC à 18 jours mais il ne représente que 4 à 6 % de l'ensemble des pics.

A 1 jour, le pic de *C. pararugosa* est dominant sur les profils SSCP des populations quantifiées sur le milieu OGA des fromages ADC. Il est aussi détecté avec un ratio voisin de 17% sur les profils SSCP des milieux OGA du fromage ABCD à 1 et 18 jours. Il n'est pas détecté dans le profil SSCP des colonies des milieux OGA des fromages ADC à 18 et 28 jours et ABCD à 8 et 28 jours. Ce résultat ne corrobore pas le résultat de quantification de cette espèce par comptage des colonies d'aspect rugueux sur le milieu OGA (Tableaux 16 et 17).

*Rhodo. babjevae* et *Y. lipolytica* ne sont détectés sur aucun des profils SSCP des colonies présentes sur les milieux OGA analysés. Cette absence est en discordance avec la quantification de ces espèces par comptage des colonies caractéristiques, en particulier, celles de *Rhodo. babjevae* facilement reconnaissables à leur couleur rose. En effet, *Rhodo. babjevae* a été quantifiée à 4%, 8% et 52% sur les milieux OGA selon les fromages analysés.

Le comptage des colonies sur le milieu OGA et l'analyse de ces mêmes populations par SSCP donne une image différente des équilibres de populations des levures. Cette divergence pourrait s'expliquer par l'amplification préférentielle de l'ADNr 18S de *C. pseudointermedia* par les amorces Lev1-Lev2 ciblant la région V4 de l'ADNr18S. Cette meilleure amplification pourrait aussi être attribuée à une plus grande quantité d'ADN initiale due à une meilleure lyse des cellules, à des tailles des colonies différentes.

De tels les biais inhérents à la lyse cellulaire ou à l'amplification préférentielle par la technique PCR-SSCP ont souvent été relatés dans la littérature (Duthoit et al., 2003). Le comptage des colonies peut donc s'avérer plus pertinent à condition de prendre certaines précautions. Il doit être vérifié que la morphologie des colonies n'évolue pas en cours d'incubation prolongée et que le stade de comptage soit bien déterminé. Par ailleurs, il convient de s'assurer que le manipulateur différencie bien les différents types de colonies : des variations d'appréciations sont possibles.

#### **4.4.2.1.1.2. Approche culture indépendante**

##### Analyse des profils SSCP obtenus après amplification de l'ADNr 16S extrait des différents types de fromages avec les amorces Gram1F-Gram2R

Comme souligné dans le chapitre 3 des résultats, les ADNr 16S des populations de *S. thermophilus* sont préférentiellement amplifiés avec le couple d'amorces ciblant les régions V3 et V2 de l'ADNr 16S bactérien. *S. thermophilus* étant une population dominante dans tous les fromages (9 log UFC/g) puisqueensemencée comme ferment, nous avons essayé de dessiner un couple d'amorces amplifiant moins préférentiellement cette espèce.



	Nom des souches	Amplification avec la Pfu polymérase
souches utilisées pour tester la validité des amorces Gram1F-Gram2R	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 142T	-
	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 301	+
	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 1075	+
	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 125	+
	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 128	+
	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 124	+
	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 258	+
	<i>S.thermophilus</i> CNRZ 1529	-
	<i>S.thermophilus</i> URFB TAO1a	+
	<i>S.thermophilus</i> URFB JB121b	+
	<i>S.thermophilus</i> URFB JB121a	+
	<i>Lb. delbrueckii</i> URFB MY8002b	+
	<i>Lb. delbrueckii</i> URFB JB123a	+
	<i>Lb. casei</i> ATCC 334T	+
	<i>Lc. garvieae</i> DSMZ 20684	+
	<i>S. millieri</i> URFB 1123	+
	<i>Enterococcus faecalis</i> URFB 759	+
	<i>Ln pseudomesenteroides</i> CNRZ 77T	+
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> URFB 161	+
Souches utilisées lors de la fabrication des fromages	<i>L. monocytogenes</i>	+
	<i>S.thermophilus</i> URFB MY800 1a	<b>F</b> +
	<i>Lactobacillus casei</i>	+
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	+
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<b>A</b> +
	<i>Lactobacillus farciminis</i>	+
	<i>Leuconostoc citreum</i>	+
	<i>Ln pseudomesenteroides</i>	+
	<i>Enterococcus faecalis</i>	+
	<i>Enterococcus hirae</i>	+
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+
	<i>Staphylococcus equorum</i>	+
	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	+
	<i>Microbacterium</i> sp.	+
	<i>Corynebacterium flavescens</i>	<b>B</b> +
	<i>Corynebacterium casei</i>	+
	<i>Brevibacterium linens</i>	+
	<i>Exiguobacterium</i> sp.	+
	<i>Kocuria rhizophila</i>	+
	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	-
	<i>Rothia</i> sp.	+
	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	-
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	+
	<i>Commamonas testosteroni</i>	<b>C</b> +
	<i>Acinetobacter</i> sp.	+
	<i>Chryseobacterium</i> sp	+
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-

**Tableau 18 : Résultats des amplifications de l'ADNr 16S avec les amorces Gram1F-Gram2R réalisées avec l'enzyme Pfu polymérase**

+ : bandes d'ADN visualisées sous rayons Ultra-Violet ; - : bandes non visualisées sous UV,

ATCC : American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) ; DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany) ; URFB : Unité de Recherches Fromagères Bactéries (Aurillac, France)

F : ferment ; A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif

Especies inoculadas	brin marqué à l'Hexachloro derivative of fluorescein (HEX)			brin marqué à la fluorescein phosphoramidite (NED)		
	pic dominant	pic sous dominant		pic dominant	pic sous dominant	
<i>Bacterium sp.</i>	6937			7208		
<i>Bacterium linens</i>	6963	7005		7207	7265	7319
<i>Clostridium sp.</i>	7032	7310		7318		
<i>Clostridium amnigenus</i>	7043	7053		4595	7316	7357 7377
<i>Clostridium nicotianae</i>	7057			7275		
<i>Clostridium sp.</i>	7061	7105		7327		
<i>Clostridium monocytogenes</i>	7083	7125		7318		
<i>Clostridium testosteroni</i>	7102			4597	7260	7284
<i>Clostridium sp.</i>	7140			7310		
<i>Clostridium eudomesenteroides</i>	7176			7403		
<i>Clostridium faecalis</i>	7182			7403		
<i>Clostridium casei</i>	7191			7323		
<i>Clostridium caseolyticus</i>	7197	7467	7529	7467	7436	
<i>Clostridium equorum</i>	7199	7456	7514	7451	7456	
<i>Clostridium xylosus</i>	7200	7436		7436		
<i>Bacillus casei</i>	7202			7428		
<i>Clostridium hiraе</i>	7239			4596	7476	
<i>Clostridium citreum</i>	7245			7469		
<i>Clostridium rhizophilia</i>	7256	7222	7415	7415		
<i>Clostridium thermophilus</i>	7263			7432	7392	
<i>Clostridium flavescens</i>	7283			7425		
<i>Bacillus plantarum</i>	7305	7316		7601		
<i>Bacillus farciminis</i>	7313			7550	7576	
<i>Bacillus curvatus</i>	7318			7549		
<i>Clostridium rhamnosum</i>	NA			NA		
<i>Clostridium putida</i>	NA			NA		
<i>Clostridium maltophilia</i>	NA			NA		

**Tableau 19: Pic d'élution (exprimé d'après les scans sur le profil SSCP) des différentes espèces analysées par la technique de SSCP après amplification, de la région Gram1F-Gram2R.**

■ : séparation sur brin marqué à NED, quand coélution sur brin marqué à HEX, NA= non amplifié

■ : Coélutions

pic	combinaisons			ABC			ABD			BDC			ADC			ABCD		
	Stade de prélevement	1j	8j	18j	28j	1j	8j	28j	1j	8j	18j	28j	1j	18j	28j	8j	18j	28j
<i>Leuconostoc citreum</i>		83	79	36	83	92	79	57					58	12	8	66	58	53
<i>Lactobacillus casei</i>		*	*	*	*	*	*	*					*			*	*	*
<i>Coryne. casei</i>		*	*	*	*	*	*	*								*	*	*
<i>Staph. equorum</i>		3	3	9	<1	*	11	* 31	*	2	*	<1	*	4	*	4	*	6
<i>Staph. xylosus</i>																		
<i>Macrococcus caseolyticus</i>																		
<i>Enterococcus faecalis</i>		<1	2	<1												<1	1	2
<i>Ln pseudomesenteroides</i>								<1										
<i>Kocuria rhizophila</i>		10	10	46	17	<1	<1	9		10	24	30	7			27	34	40
<i>Exiguobacterium sp.</i>		4	*	<1	* <1	*	8	10	2	2	*	*	93	*		2	*	<1
<i>Enterobacter amnigenus</i>		<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	77	62	<1	<1			1	<1	<1
<i>Corynebacterium flavesceus</i>																		
<i>Chryseobacterium sp</i>		<1	<1	9	<1	<1	<1	1		8	10	65	<1	42	88	<1	<1	<1
<i>S. thermophilus</i>																		
<i>Lactobacillus plantarum</i>																		
<i>Lactobacillus farciminis</i>																		
<i>Lactobacillus curvatus</i>																		
<i>Enterococcus hirae</i>																		
<i>Brevibacterium linens</i>																		
<i>Microbacterium sp.</i>																		
<i>L. monocytogenes</i>																		
<i>Acinetobacter sp.</i>																		
<i>Rothia sp.</i>																		
<i>Arthrobacter nicotianae</i>																		
<i>Comamonas testosteroni</i>		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomonas putida</i>		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Brachybacterium rhamnosum</i>																		

**Tableau 20: Ratios des pics SSCP (Pi) des différents types de fromages à 1, 8, 18 et 28 jours après amplification avec les amorces Gram1F-Gram2R**

1, 8, 18, 28 : jours auxquels les fromages ont été analysés. Pour tous les profils SSCP, la proportion de chaque pic a été calculée grâce à la formule suivante :  $P_i = a_i \times 100 / \sum a_i$ , où  $P_i$  représente la proportion de chaque pic  $i$  et  $a_i$  l'aire d'un pic. <1 : aire du pic non calculable car trop faible mais les espèces ont été détectées sur les profils. NA : ADNrl6S des souches pures n'a pas été amplifié avec les amorces Gram1F-Gram2R. ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures. Les colonnes barrées signifient que les espèces n'ont pas été détectées.

L'alignement multiple de 14 ADNr 16S a mis en évidence que l'ADNr 16S de *S. thermophilus* et de *Lc. lactis* différait de l'ADNr 16S des autres bactéries à Gram positif par un mismatch en penultième position sur le primer Gram 1F (sens 5'-3') (Figure 15)

Les résultats de l'amplification PCR sont présentés dans le tableau 18. Sur 7 ADNr 16S de souches de *Lc. lactis*, 6 ont été amplifiées avec la polymérase Pfu. Les ADNr 16S de toutes les souches de *S. thermophilus* ont été amplifiés avec cette polymérase. En raison de l'activité exonucléase de la polymérase Pfu, l'amorce Gram 1F serait moins sélective que théoriquement. Les ADNr 16S de *L. monocytogenes* et de 24 souches sur les 27 souches composant le cocktail ABC ont été amplifiés avec la polymérase Pfu. Seuls les ADNr 16S de *Ps. putida*, *Stenotro. maltophilia* et *Brachy. rhamnosus* n'ont pas été amplifiés.

Toutefois, il semblerait que l'amplification de l'ADNr 16S de *S. thermophilus* avec les amorces Gram1F-Gram2R et la polymérase Pfu soit moins préférentielle qu'avec les amorces ciblant la région V2. La comparaison des profils SSCP, après amplification de l'ADNr16S de la région V2 et de la région ciblée par les amorces Gram1F-Gram2R d'un même fromage, montre un plus grand nombre de pics après amplification avec les amorces Gram1F-Gram2R.

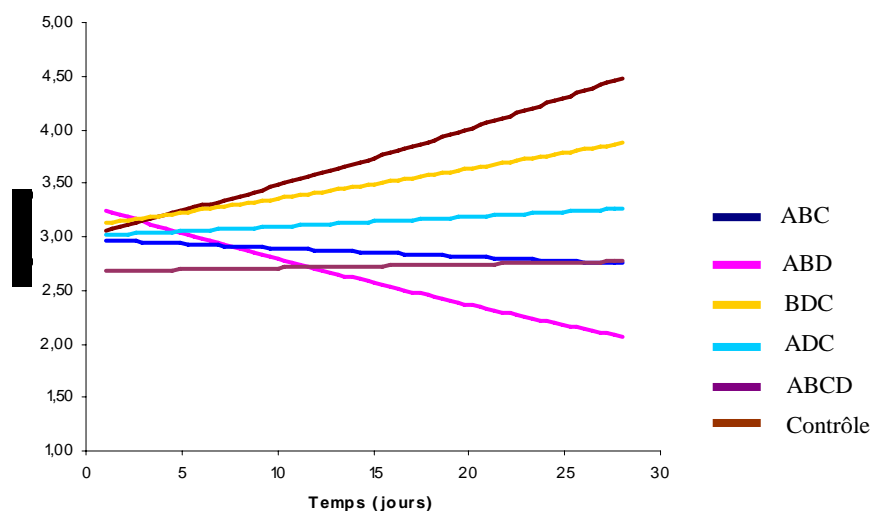
Afin d'assigner ces pics à des séquences nucléotidiques des espèces inoculées, un référentiel a été créé en analysant par SSCP les cultures pures.

Sur les profils SSCP du brin marqué à HEX, les séquences nucléotidiques des espèces *Enterob. amnigenus* et *Exiguu. sp.* coéluent en un pic, celles de *Rothia sp.* et *Acinetobacter sp.* coéluent en un autre pic, celles de *Coryne.casei*, *Macro. caseolyticus*, *Staph. equorum*, *Staph.s xylosus* et *Lb. casei* comigrent également en un même pic ainsi que celles de *Lb. farciminis* et *Lb. curvatus* comme il est indiqué dans le tableau 19. L'analyse SSCP de l'autre brin marqué à NED a permis de séparer la plupart des espèces qui coéluaient exceptées les espèces *Lb. casei* et *Lb. curvatus* dont les séquences nucléotidiques comigrent quel que soit le brin analysé. Les deux brins de l'ADN ont donc été pris en compte afin d'assigner les pics à une espèce par rapport au référentiel d'analyse des souches pures.

Les spectres SSCP après amplification de l'ADNr 16S avec les amorces Gram1F-Gram2R des différents fromages ont été analysés en calculant le ratio de chaque pic sur les profils de SSCP du brin d'ADN marqué à HEX.

Les résultats de l'application de la technique de SSCP en prenant en compte les ratios des pics dominants sur des ADN extraits de fromages à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage sont rassemblés dans le tableau 20.

Sur les profils Gram1F-Gram2R-SSCP des fromages ABCD et ABC, les pics correspondant à *Ln. citreum* et *Koc. rhizophilia* représentent plus de 90% de la surface totale des pics. Des variations des pourcentages de ces deux pics sont observées en cours d'affinage. Le ratio du pic assigné à *Ln. citreum* tend à diminuer entre 1 et 18 jours sur le profil SSCP du fromage ABC et entre 1 et 28 jours pour celui du fromage ABCD alors que celui de *Koc. rhizophilia* augmente. L'ensemble des ratios des autres pics représente moins de 10% des profils. Ces pics pourraient être assignés à *E. faecalis*, *Enterob.*



**Figure 16 : Droites de régression des courbes du développement de *Listeria monocytogenes* dans les fromages en fonction des combinaisons microbiennesensemencées dans le lait**  
 ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou moins complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

*amnigenus* et à une ou plusieurs des espèces suivantes *Lb. casei*, *Coryne. casei* et *Staph. equorum* dont les séquences nucléotidiques coéluent dans un même pic.

Les profils SSCP des fromages ABD et ADC sont assez similaires à ceux d'ABCD et ABC avec la très forte dominance de *Ln. citreum* dont le ratio décroît en cours d'affinage. A 1 jour, le second pic le plus important est assigné à la population d'*Exiguu. sp.* mais son ratio diminue entre 8 et 18 jours. Après 8 jours, le pic assigné à *Lb. casei*, *Coryne. casei* et *Staph. equorum* représente plus de 10% de l'ensemble des ratios des profils. Par contre, par rapport aux profils des fromages ABCD et ABC, le pic de *Koc. rhizophilia* des profils SSCP des fromages ABD est très faible (non calculable à 1 et 8 jours et inférieur à 9% à 28 jours). De façon assez surprenante, le profil SSCP des fromages ADC est dominé par le pic de *S. thermophilus*, plus particulièrement important à 18 et 28 jours (>77%). Jusqu'à 28 jours, le seul autre pic important est celui de *Ln. citreum*. A 28 jours, les pics correspondant à *Lb. casei* (10%), *Ln. mesenteroides* (3%), *E. faecalis* (2%) sont détectés mais représentent moins de 10% des aires des pics.

Le pic de *Coryne. flavescentis* est dominant sur les profils BDC à 1 et 8 jours. Il diminue entre 8 et 18 jours pour devenir inférieur à 1% à 18 et 28 jours. Par contre, le pourcentage du pic de *Koc. rhizophilia* augmente jusqu'à 18 jours pour diminuer ensuite. A 28 jours, le pic d'*Exiguu. sp.* et d'*Enterob. amnigenus* domine le profil (>90%) alors qu'à 18 jours, le pic de *S. thermophilus* est majoritaire.

#### Comparaison des résultats des dénombrements et des analyses SSCP

Les résultats de SSCP et de quantification par dénombrement sont concordants sur la dominance des genres dans les fromages. Ainsi,

- les populations de *Leuconostoc* sont parmi les populations dominantes des fromages ABCD, ABC et ABD,
- les populations de *Lactobacillus* constituent les populations dominantes,
- *S. thermophilus* ensemencé en forte concentration ( $10^7$  UFC/ml) dans les laits est quantifié en forte concentration sur milieu de culture. Il n'aurait pas du être détecté par SSCP compte tenu des amorces développées et ce fut le cas dans de nombreux profils SSCP de fromages. Néanmoins, un pic de *S. thermophilus* domine sur les profils des fromages BDC à 18 jours et ADC à 18 et 28 jours. Cette amplification pourrait être attribuée à l'amplification préférentielle de son ADNr 16S par les amorces Gram1F-Gram2R lorsque les bactéries lactiques (groupe A) ou les bactéries non lactiques à Gram positif (groupe B) sont absentes.

Au regard des biais liés à l'extraction et à l'amplification, une certaine prudence s'impose quant aux conclusions sur l'implantation des souches. La détection de certaines espèces par SSCP directe après amplification de la région Gram1F-Gram2R de l'ADNr 16S permet de conclure sur leur implantation. Ainsi, les espèces suivantes *Ln. citreum*, *Lb. casei*, *Coryne. casei*, *Staph. equorum*, *E. faecalis*,

Fromages	<i>L. monocytogenes</i> 1-28j	<i>L. monocytogenes</i> 1-6j	<i>L. monocytogenes</i> 8-28j	Pop max	t pour pop max
ABCD	1,0 a	1,18 NS	0,96 a	3,28	11
ABD	1,01 a	1,39 NS	0,91a	3,08	4
ABC	1,2 ab	1,05 NS	1,23a	3,48	4
ADC	1,55 bc	1,16 NS	1,64b	3,56	11
BDC	1,91 cd	1,39 NS	2,09 bc	4,00	28
contrôle	2,17 d	1,25 NS	2,40 c	4,08	15

**Tableau 21: Niveau de *L. monocytogenes* dans les fromages.**

Les résultats sont la moyenne des différences de numération (LogNt-LogN<sub>0</sub>) des fromages entre 1-6 jours et 8-28 jours.

Nt=UFC/g au temps t, t= temps en jours; N<sub>0</sub>= UFC/ml X10

p = niveau de significativité, NS : non significatif, \* = p<0,05

Dans la même colonne, les lettres a, b et c indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b<c). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

Fromages	pH 1-6j	pH 8-28j	ES 1-6j	ES 8-28j
ABCD	5,41 NS	5,41 NS	48 NS	51 b
ABD	5,44 NS	5,44 NS	47,89 NS	49 a
ABC	5,42 NS	5,42 NS	47 NS	49 a
ADC	5,41 NS	5,41 NS	48,31NS	48,7 a
BDC	5,43 NS	5,43 NS	47,5 NS	48,39a
contrôle	5,42 NS	5,42 NS	50 NS	53,07c

**Tableau 22 : Valeurs de pH et extrait sec (ES) des fromages entre 1 et 6 jours et 8 et 28 jours.**

p = niveau de significativité, NS : non significatif, \* = p<0,05

Dans la même colonne, les lettres a, b et c indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b<c). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

*Ln. pseudomesenteroides*, *Koc. rhizophilia*, *Exigu. sp.*, *Enterob. amnigenus*, *Coryne. flavescens* et *Chryseo. sp.* se sont implantées dans les fromages. Les résultats de la SSCP directe et la présence de *Ln. citreum* sur les milieux PCA+L+I semblerait indiquer que cette espèce soit une population dominante dans les fromages. La présence de *Coryne. casei*, *Coryne. flavescens* et *Staph. equorum* est confirmée comme le laissaient envisager les dénombrements sur le milieu RPF. L'analyse SSCP des populations présentes sur les milieux complète l'image obtenue par SSCP directe et renseigne sur l'implantation de *Com. testosteroni* et *Ps. putida*. Il est par contre difficile de conclure sur l'implantation des autres espèces sur la seule analyse directe SSCP des fromages. Des interrogations subsistent sur l'implantation de *Koc. rhizophilia*, *Rothia sp.*, *Arthro. nicotianae* et de *Brevi. linens*. En effet, la coélution de leur séquence nucléotidique en un seul pic sur les profils SSCP après amplification de la région V3 de l'ADNr16S ne permet pas de conclure quelle espèce était présente. De plus, le fait que l'ADNr 16S de certaines espèces n'ait pas pu être amplifié avec le couple d'amorces Gram1F-Gram2R ne permet pas de conclure sur leur implantation en fromages. La SSCP ciblant l'ADNr 18S n'a pas été appliquée pour analyser directement les populations de levures car d'une part ces espèces peuvent être quantifiées sur milieu OGA et d'autre part l'application de la SSCP sur les populations du milieu OGA sembleraient indiquer une amplification préférentielle de l'ADN de certaines espèces (cf. paragraphe 4.4.2.1.1.4).

#### **4.4.2.1.2. Effet des ensemencements sur le développement de *L. monocytogenes***

Les droites de régression des courbes du développement de *L. monocytogenes* dans les fromages en fonction des ensemencements sont présentées dans la figure 16. Les résultats de la variation moyenne du niveau de *L. monocytogenes* entre le temps 0 et les différents temps d'affinage sont présentés dans le tableau 21.

Jusqu'à 6 jours, la croissance de *L. monocytogenes* est identique quelle que soit la communauté microbienne inoculée que celle-ci soit la plus simple avec uniquement *S. thermophilus* ou la plus complexe avec les 4 grands groupes (ABCD).

Entre 6 jours et 28 jours, tous temps d'affinage analysés confondus, la communauté complexe (ABCD) est plus inhibitrice que *S. thermophilus* seul. L'omission du groupe des bactéries à Gram négatif ne modifie pas l'inhibition. L'omission des bactéries non lactiques à Gram positif (du groupe B) dans l'inoculation initiale diminue l'inhibition de façon significativement plus importante que l'omission des levures. Par contre, l'omission du groupe de bactéries lactiques lève complètement l'inhibition, avec un développement de *L. monocytogenes* similaire à celui observé dans les fromages avec uniquement *S. thermophilus*. Le niveau de population maximal est plus élevé dans les fromages BDC et dans les fromages dont le lait a été inoculé avec uniquement *S. thermophilus*. Il est atteint beaucoup plus tardivement que dans les fromages préparés avec les bactéries lactiques (Groupe A).



	L lactate	D- lactate
ABC	12,18 a	2,00 ab
ABD	12,18 a	2,17 b
BDC	12,32 a	0,24 ab
ADC	9,98 a	1,41 ab
ABCD	11,11 a	1,49 ab
contrôle	10,74 a	0,00 a
p	NS	*

**Tableau 23: Teneurs moyennes (mg/g) en acides organiques.**

Les teneurs D et L-lactate ont été dosés par méthode enzymatique.

Les valeurs sont les moyennes des teneurs à tous les temps d'analyse.

p = niveau de significativité, NS : non significatif, \* =  $p < 0,05$

Dans la même colonne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents ( $a < b$ ). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

	Acide acétique					Acide butyrique				
	1j	15j	22j	28j	moyenne	1j	15j	22j	28j	moyenne
ABC	0	385	733	1544	887 NS	0	2,5	4,6	6,9	4,6 NS
ABD	0	579	1345	1113	1012 NS	0	3,4	5,3	6,7	5,1 NS
ADC	0	967	1088	439	831 NS	0	0,0	3,0	1,7	1,6 NS
ABCD	0	747	1193	1330	1090 NS	0	8,5	7,3	5,1	7,0 NS
BDC	0	0	600	42	213 NS	0	4,3	5,5	7,3	5,7 NS
Contrôle	0	0	0	0	0 NS	0	0,0	0,0	0	0,0 NS

**Tableau 24 : Teneurs en acides acétique et butyrique (mg/kg) dans les fromages.**

Les teneurs en acides acétique et butyrique ont été dosés par SPME-CPG. Moyenne : moyenne des teneurs entre 15 et 28 jours. j : jours ; NS : non significatif à  $p < 0,05$

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

#### **4.4.2.2. Evolution des paramètres physico-chimiques**

##### **4.4.2.2.1. pH**

Les valeurs de pH et d'acidité Dornic ne sont pas significativement différentes entre des fromages fabriqués avec des combinaisons microbiennes différentes. Les écarts entre ces valeurs sont inférieurs à 0,1 unités de pH. En cours d'affinage, le pH évolue peu ( $\Delta \text{pH} < 0,1$  unité) et la présence de bactéries lactiques autre que *S. thermophilus* ne change pas les valeurs de pH des fromages (Tableau 22).

##### **4.4.2.2.2. Extraits secs**

Les fromages ont des extraits secs significativement différents (Tableau 22). Les fromages fabriqués avec *S. thermophilus* seul ou avec le cocktail des 4 groupes microbiens ont des extraits secs significativement plus importants que ceux fabriqués avec les autres communautés. Le pH en cours de fabrication ne peut pas expliquer les différences d'extrait sec car les différences de valeurs de pH entre les différents fromages sont inférieures à 0,1 unité de pH aux temps 1h, 3h, 5h et 9h après emprésurage.

Il semblerait que ces différences soient plus inhérentes à un effet cuve de fabrication ou condition de pressage qu'à l'ensemencement.

#### **4.4.2.3. Comparaison des teneurs en acides et composés volatils**

##### **4.4.2.3.1. Analyse des acides**

Les acides 2-méthyl-butyrique et valérique ne sont jamais détectés dans les fromages. Les acides 3-méthyl-butyrique et caproïque le sont soit à des concentrations très faibles (inférieures à 2mg/kg) soit à l'état de traces.

Les teneurs en acide lactique L ne sont pas significativement différentes dans tous les fromages alors que l'acide lactique D est uniquement produit dans les fromages fabriqués avec le groupe des bactéries lactiques (Tableau 23).

L'acide acétique et l'acide butyrique ne sont pas détectés dans les fromages avec uniquement *S. thermophilus* et à 1 jour dans les autres fromages. L'acide acétique est essentiellement produit en cours d'affinage et en quantité importante dans les fromages fabriqués avec le groupe des bactéries lactiques (Groupe A). Sa teneur diminue après 22 jours. L'acide butyrique est produit en cours d'affinage et sa cinétique de production varie d'un fromage à l'autre. Elle serait la plus faible dans le

amilles	molécules	ABCD	ABC	ADC	ABD	BDC	Contrôle	p
aldéhydes	butanal	3,82	3,62	3,55	3,58	<b>4,19</b>	<b>4,21</b>	NS
	2-méthyl-propanal	4,30	4,22	4,42	4,29	<b>4,61</b>	4,59	NS
	3-méthyl-butanal	3,40	3,51	4,09	3,70	<b>4,09</b>	2,97	NS
	2-méthyl-butanal	3,38	3,34	4,09	2,79	3,30	2,76	NS
alcools	1-pentanol	4,61	4,50	4,53	4,70	4,44	4,30	NS
	2-propanol	<b>7,51 ab</b>	<b>7,52 ab</b>	<b>7,42 ab</b>	<b>7,58 b</b>	<b>7,29 ab</b>	<b>7,18 a</b>	*
	2-butanol	<b>5,45 b</b>	<b>5,31 b</b>	<b>5,32 b</b>	<b>5,34 b</b>	<b>3,67 a</b>	<b>3,30 a</b>	*
	2-pentanol	<b>4,81</b>	<b>4,77</b>	<b>4,71</b>	<b>4,81</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>	NS
	2-heptanol	<b>4,00</b>	<b>4,06</b>	<b>4,05</b>	<b>4,13</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>	NS
	2-méthyl-1-propanol	5,06 ab	5,03 ab	4,99 ab	5,15 b	5,06 ab	4,90 a	*
	3-méthyl-1-butanol	<b>5,33 b</b>	<b>5,38 b</b>	<b>5,05 b</b>	<b>5,17 b</b>	<b>5,68 b</b>	3,98 a	*
	2-méthyl-1-butanol	3,32 ab	<b>3,54 ab</b>	2,80 ab	2,88 ab	<b>3,99 b</b>	2,28 a	*
cétones	2-hexanone	<b>2,40</b>	<b>2,64</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>	<b>3,05</b>	<b>2,78</b>	NS
	3-méthyl-2-butanone	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	2-butanone	5,76	5,70	5,73	5,76	<b>6,37</b>	<b>6,40</b>	NS
	4-méthyl-2-pentanone	3,68	3,04	3,25	3,08	<b>4,16</b>	<b>4,19</b>	NS
	2,3-butanedione	6,62	6,45	6,54	6,60	6,97	7,04	NS
	2,3-pentanedione	5,08	4,93	4,98	5,05	5,50	5,45	NS
esters	éthyl formiate	<b>3,99</b>	3,71	<b>4,17</b>	<b>3,96</b>	2,35	2,38	NS
	éthyl butanoate	4,77	4,92	5,01	<b>5,08</b>	5,35	4,45	NS
	éthyl acétate	5,26	5,89	5,91	5,91	5,93	5,90	NS
	éthyl hexanoate	<b>2,70</b>	<b>3,08</b>	<b>3,27</b>	<b>3,15</b>	<b>3,35</b>	2,00	NS
furanes	2-éthyl-furan	<b>3,75 b</b>	2,54 a	3,33 ab	<b>3,56 ab</b>	2,76 ab	2,54 a	*
	2-pentyl-furan	2,81 ab	2,08 ab	2,30 ab	2,28 ab	<b>2,00 a</b>	<b>2,00 a</b>	*
aromatiques	styrène	4,88	4,76	4,87	4,93	4,79	4,74	NS
hydrocarbures	1,2-diméthyl benzène	5,16	4,92	5,09	4,97	5,33	5,49	NS
	dl limonène	3,91	3,87 a	3,83 a	3,87 a	4,01 a	3,51 a	*
	chloroforme	6,08 b	5,87 a	6,01 ab	5,99 ab	5,93 ab	6,02 ab	*
	tétrachlorométhane	3,85 b	3,32 a	3,69 ab	3,76 ab	3,52 ab	3,56 ab	*

**Tableau 25 : Valeurs moyennes (moyenne calculée en prenant en compte les valeurs aux temps d'analyse 1, 15, 22 et 28 jours) des log des aires de pics des molécules.**

Les composés ont été analysés par GC-MS comme décrit dans le paragraphe 3.5 du Matériel et Méthodes. En italique figurent des données en dessous du seuil de détection de la méthode d'analyse p = niveau de significativité, NS : non significatif, \* = p<0,05

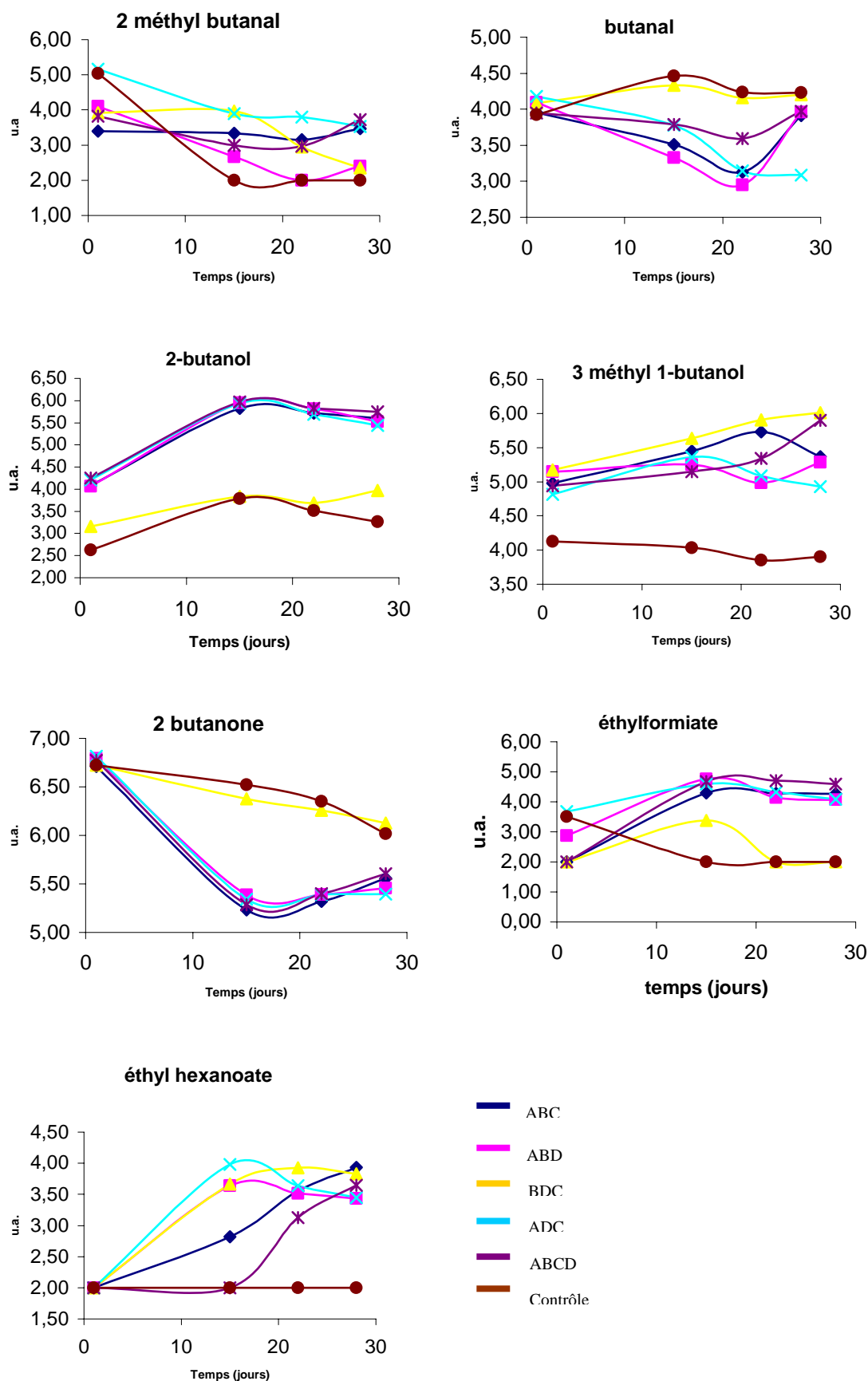
Dans la même colonne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

15-1									
molécules		ABC	ABD	ADC	ABCD	BDC	contrôle		
Aldéhydes	propenal	-0,62	-0,58	-0,52	-0,81	-0,20	-0,51		
	butanal	-0,44	-0,77	-0,40	-0,16	0,24	0,54		
	pentanal	-0,48	-0,13	0,23	0,41	0,38	1,03		
	hexanal	-0,39	0,20	0,33	0,92	0,36	1,46		
	octanal	0,39	-0,37	0,87	0,94	1,22	1,25		
	2-méthyl-propenal	-0,59	-0,73	-0,84	-0,63	-0,22	-0,74		
	3-méthyl-butanal	0,98	-0,43	-0,94	0,97	0,05	-2,26		
	2-méthyl-butanal	-0,06	-1,43	-1,26	-0,83	0,06	-3,04		
	benzaldéhyde	0,01	-0,03	0,14	0,29	0,06	0,03		
	éthanol	0,22	0,09	0,24	0,13	0,09	-0,03		
Alcools	1-pentanol	-0,10	0,04	0,05	-0,24	-0,04	0,19		
	2-propanol	0,29	0,32	0,46	0,46	0,06	-0,07		
	2-butanol	1,75	1,88	1,73	1,71	0,68	1,16		
	2-pentanol	3,41	3,52	2,75	3,48	0,00	0,00		
	2-heptanol	2,46	2,65	2,75	2,41	0,00	0,00		
	2-méthyl-1-propanol	0,00	0,15	0,09	0,22	0,04	0,06		
	3-méthyl-1-butanol	0,47	0,10	0,54	0,21	0,46	-0,09		
	2-méthyl-1-butanol	1,57	0,75	2,04	1,60	1,19	0,76		
	3-méthyl-2-butanol	1,63	2,76	2,96	3,01	1,62	2,35		
	butanediol?	1,02	2,80	2,38	3,68	3,24	2,68		
Cétones	2-propanone	-1,58	-1,41	-1,35	-1,49	-0,37	-0,24		
	2-butanone	-1,48	-1,41	-1,48	-1,49	-0,34	-0,20		
	2-pentanone	-0,36	-0,54	-0,23	-0,23	0,02	0,03		
	2-hexanone	1,54	0,00	0,00	0,00	1,54	1,23		
	4-méthyl-2-pentanone	-2,06	-1,17	-0,60	-0,41	0,15	0,16		
	2,3-butanedione	-1,34	-1,19	-1,01	-0,89	-0,19	-0,10		
	2,3-pentanedione	-1,17	-1,13	-0,85	-0,79	-0,17	-0,18		
	3-hydroxy-2-butanone	-3,14	-3,37	-3,29	-3,13	2,48	0,74		
	éthyl formate?	2,30	1,90	0,91	2,68	1,39	-1,51		
	éthyl butanoate	0,71	0,77	0,99	1,17	0,63	0,70		
Composés soufrés	éthyl hexanoate	0,82	1,64	1,98	0,00	1,66	0,00		
	méthanthiol	0,00	-0,69	-1,51	0,00	0,00	-1,12		
	diméthyl-sulfide	-0,09	0,36	0,17	0,29	0,12	0,19		
	carbon-disulfide	-0,31	0,24	0,67	0,49	0,27	0,46		
	2-éthyl-furane	-0,39	-0,41	0,15	-0,15	1,16	0,17		
	2-pentyl-furane	0,00	-1,12	1,21	-0,33	0,00	0,00		
	Ethers								
	dibutyl-ether	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	Alcènes								
	2-méthyl-2-butène	-0,35	-0,07	0,49	0,12	-0,49	-0,35		
dérivés benzéniques	2-méthyl-1,3-butadiene	-0,09	0,11	0,01	0,21	0,06	0,10		
	styrène	-0,44	-0,88	-0,32	-0,13	-0,10	-0,25		
	Terpènes								
	alpha-pinène	1,41	1,70	0,23	1,84	-0,07	1,77		
	dérivés chlorés								
	tetrachloromethane	-0,06	-0,02	-0,13	0,14	0,23	-0,05		
	dérivés nitrogénés								
	benzenitrile	-0,11	-0,12	0,12	0,16	-0,05	-0,12		
22-15									
		ABC	ABD	ADC	ABCD	BDC	contrôle		
		-0,21	-0,32	-0,53	-1,58	-0,15	-0,10		
		-0,39	-0,38	-0,63	-0,19	-0,17	-0,23		
		0,03	-0,18	-0,81	-0,26	-0,18	-0,50		
		0,12	-0,15	-0,37	-0,22	-0,04	-0,61		
		-1,62	-0,72	-1,91	-0,80	-0,05	-0,42		
		-0,19	-0,35	-0,39	-0,21	-0,17	-0,18		
		-0,06	0,09	-0,51	0,45	-0,17	-0,65		
		-0,18	-0,67	-0,10	-0,02	-1,02	0,00		
		0,10	-0,06	-0,39	-0,02	-0,12	0,13		
		-0,09	0,01	-0,07	-0,16	-0,07	-0,01		
		-0,12	-0,40	-0,53	-0,35	-0,21	-0,52		
		0,03	0,00	-0,08	-0,10	-0,02	0,00		
		-0,11	-0,14	-0,25	-0,14	-0,15	-0,27		
		0,29	0,29	0,03	0,30	0,00	0,00		
		0,30	0,30	-0,03	0,29	0,00	0,00		
		0,11	-0,18	-0,16	-0,16	-0,09	0,02		
		0,28	-0,26	-0,27	0,19	0,27	-0,19		
		0,29	-1,57	-1,22	-0,34	0,05	-0,37		
		0,18	-0,10	-0,24	-0,48	0,39	0,51		
		-0,16	0,31	0,24	-0,88	-0,09	-0,11		
		0,26	0,15	0,05	-0,24	-0,19	-0,18		
		0,09	0,00	0,05	0,11	-0,12	-0,17		
		0,46	0,20	0,35	0,35	0,13	-0,02		
		-1,54	0,00	0,00	0,00	-0,38	-1,23		
		0,41	-1,15	-1,30	-0,75	-0,09	-0,13		
		0,45	0,16	0,13	0,13	0,10	-0,09		
		0,20	-0,05	-0,27	-0,01	-0,22	-0,09		
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	-3,74		
		-0,02	-0,62	-0,27	0,02	-1,39	0,00		
		0,20	0,01	-0,01	-0,05	0,15	0,07		
		0,74	-0,12	-0,34	1,13	0,26	0,00		
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		0,31	-0,40	-0,07	0,05	0,10	-0,04		
		0,45	0,06	-0,44	-0,01	0,05	-0,22		
		0,37	0,05	-0,53	0,27	-1,20	-1,16		
		0,00	0,00	-1,21	-0,19	0,00	0,00		
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		0,14	-0,23	-0,33	0,49	0,21	0,33		
		-0,11	0,18	-0,23	0,33	-0,03	-0,05		
		0,18	-0,04	-0,06	-0,17	-0,08	-0,04		
		0,15	0,03	-0,19	0,00	-0,04	-0,03		
		0,09	-0,56	-0,13	0,15	-0,71	0,06		
		0,60	0,13	-0,03	0,07	-0,01	-0,22		
		0,20	0,14	-0,23	-0,07	-0,12	0,07		
28-22									
		ABC	ABD	ADC	ABCD	BDC	contrôle		
		0,38	0,55	0,01	1,81	-1,26	-0,01		
		0,79	1,01	-0,06	0,38	0,04	0,00		
		0,55	0,55	0,12	0,25	0,11	-0,26		
		0,30	0,14	-0,12	0,01	-0,11	-0,23		
		2,04	1,08	1,01	1,41	-0,29	-1,17		
		0,19	0,36	-0,27	0,20	-0,20	-0,02		
		0,50	0,52	0,00	0,47	0,67	0,31		
		0,32	0,40	-0,27	0,75	-0,60	0,00		
		0,09	0,13	-0,10	-0,14	0,01	-0,24		
		-0,09	-0,09	-0,32	0,00	-0,11	-0,16		
		0,08	0,06	-0,26	0,15	0,07	-0,03		
		-0,09	-0,16	-0,47	-0,05	-0,09	-0,14		
		-0,12	-0,28	-0,25	-0,07	0,28	-0,25		
		0,27	0,07	0,16	0,22	0,00	0,00		
		0,26	-0,02	0,00	0,20	0,00	0,00		
		-0,03	-0,12	-0,08	0,02	-0,03	-0,12		
		-0,36	0,30	-0,16	0,56	0,11	0,05		
		-0,41	1,11	-0,47	1,16	0,05	-0,38		
		0,47	0,23	-0,31	0,79	-0,04	0,07		
		0,79	-0,64	-0,40	0,95	-0,09	0,26		
		0,14	0,05	-0,36	0,48	-0,22	0,04		
		0,24	0,07	0,01	0,21	-0,13	-0,34		
		0,43	0,39	0,44	0,47	0,27	0,19		
		1,04	0,00	0,00	1,61	0,34	1,90		
		1,28	0,84	0,52	1,04	0,33	-0,02		
		0,52	0,44	-0,07	0,28	-0,01	-0,17		
		0,26	0,06	-0,14	0,19	0,04	-0,19		
		3,65	1,67	0,00	3,45	-0,40	2,15		
		-0,01	-0,07	-0,24	-0,10	0,00	0,00		
		0,20	0,01	-0,08	0,06	0,11	-0,02		

**Tableau 26: Production à chaque temps (différences des teneurs entre 15 et 1 jour, entre 22 et 15 jours et entre 28 et 22 jours) des différents composés volatils.**

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures



**Figure 17: Exemples d'évolution au cours du temps des composés volatils de différentes familles dans les fromages fabriqués avec les combinaisons microbiennes ABCD, ABC, ABD, BDC, ADC et le fromage contrôle.**

u.a ; unité arbitraire (log des aires de pics des molécules)

ABC, ABD, BDC, ADC et ABCD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques ; C : bactéries à Gram négatif, D : levures

fromage ADC sans le groupe des bactéries à Gram positif non lactiques (groupe B) avec une production maximale à 22 jours. L'acide butyrique est produit en quantité plus importante dans les autres fromages avec une forte production dès les 15 premiers jours puis une diminution est ensuite observée dans le fromage ABCD alors que sa production augmente tout au long de l'affinage dans les fromages ABC, ABD et BDC (Tableau 24).

#### 4.4.2.3.2. Analyse des composés volatils.

Par analyse GC/MS, 113 composés volatils ont été identifiés, ils appartiennent à la famille des aldéhydes (13 composés), des alcools (20 composés), des cétones (14 composés), des esters (10 composés), des composés soufrés (5 composés), des furanes (4 composés), des éthers (2 composés), des alcanes (18 composés) des alcènes (3 composés), des dérivés benzéniques (13 composés), des terpènes (5 composés), des dérivés chlorés (3 composés) et des dérivés nitrogenés (2 composés). Quelques exemples d'évolution de composés de ces différentes familles sont montrés dans la figure 17.

Les teneurs en composés volatils des fromages avec différents cocktails microbiens ont été comparées en calculant d'une part la teneur moyenne des composés produits entre 1 et 28 jours (Tableau 25), d'autre part la production entre différents temps (différences des teneurs entre 15 et 1 jour, entre 22 et 15 jours et entre 28 et 22 jours) (Tableau 26).

Tous les fromages fabriqués avec uniquement *S. thermophilus* se caractérisent par les plus faibles teneurs en :

- 2-méthyl-butanal due à une forte diminution en cours d'affinage entre 1 et 15 jours (figure 17), et en 3-méthyl-butanal
- en 3-méthyl-1-butanol, 2-méthyl-1-butanol, 2-heptanol, 2-pentanol, 2-pentyl-furane et 2-éthyl-furane et 2-méthyl-1-propanol. Il est à noter que les 2-heptanol, 2-pentanol, 2-éthyl-furane n'ont jamais été détectés. Les teneurs de ces molécules varient peu en cours d'affinage (entre 1 et 28 jours) et le faible niveau serait imputable à des différences dès 1 jour.
- éthyl formiate avec une diminution entre 1 et 28 jours et pas de production d'éthyl hexanoate.

Ils ont par contre les teneurs les plus fortes en 2-butanone, 4-méthyl-2 pentanone, 2-3 butadénione, 2-3 pentanedione et 2 hexanone. Les teneurs en 2 hexanone augmentent particulièrement entre 15 et 28 jours.

Tous les fromages BDC fabriqués avec *S. thermophilus* et le groupe des levures (groupe D), des bactéries non lactiques à Gram positif (groupe B) mais sans le groupe des bactéries lactiques (groupe A) présentent des caractéristiques communes avec ceux fabriqués uniquement avec *S. thermophilus*.



En effet, ils ont des teneurs en cétones élevées avec une augmentation ou une faible diminution en cours d'affinage, des teneurs en 2-pentanol et 2-heptanol ou éthyl formiate faibles. Cependant, les teneurs en éthyl formiate sont produites entre 1 et 15 jours puis diminuent en cours d'affinage. Ils se distinguent des fromages fabriqués avec *S. thermophilus* seul et de ceux fabriqués avec les bactéries lactiques (groupe A) par leurs plus fortes teneurs en alcools branchés : 3-méthyl-1-propanol et 2-méthyl-1-butanol.

Tous les fromages fabriqués avec le groupe des bactéries lactiques se distinguent des précédents par les plus fortes teneurs en :

- éthyl formiate particulièrement dans les fromages (ADC) fabriqués sans le groupe des bactéries non lactiques à Gram positif (groupe B). Les teneurs en éthyl formiate sont importantes à 1 jour dans les fromages ADC mais augmentent moins entre 1 et 15 jours que dans les fromages ABCD, ABC et ABD qui contiennent également des bactéries lactiques. Elles diminuent d'affinage dans les fromages fabriqués avec *S. thermophilus* seul.
- en alcools – éthanol, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-heptanol, 2-méthyl-1-butanol, 3-méthyl-1-butanol – qui sont essentiellement produits jusqu'à 15 jours.

Ils ont par contre les teneurs les plus faibles en cétones (2-butanone, 4-méthyl-2-pentanone, 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione) et aldéhydes (butanal, 2-méthyl-propanal, 3-méthyl-butanal, 2-méthyl butanal). Leur faible niveau serait dû à une forte diminution entre 1 et 15 jours même si une production est observée en cours d'affinage, après 22 jours en particulier dans les fromages préparés avec les bactéries lactiques (groupe A) et les bactéries à Gram positif non lactiques (groupe B) pour les aldéhydes. La 2 hexanone n'est jamais détectée dans les fromages ABD et ADC et elle n'est produite dans les fromages ABCD qu'après 22 jours d'affinage.

#### **4.4.3. Conclusions**

Ces résultats sembleraient indiquer que les bactéries lactiques seraient les plus aptes à inhiber *L. monocytogenes* alors que les bactéries à Gram négatif (groupe C) n'interviendraient pas. Les bactéries d'affinage (groupe B) associées aux bactéries lactiques (groupe A) pourraient jouer un rôle dans le contrôle de *L. monocytogenes*. L'inhibition de *L. monocytogenes* ne serait pas due à la diminution des valeurs de pH mais semblerait plutôt associée à la production d'acides (acides lactique, acétique et butyrique) et de composés volatils (alcools, éthyl formiate).



Groupes genre	ABCD				ABD				AB				AD				BD			
	ni	nd(t+1h)	max	t	nd(t+1h)	max	t	nd(t+1h)	max	t	nd(t+1h)	max	t	nd(t+1h)	max	t				
Thermophiles (M17-42°C)	7,00	7,10	9,21	28	7,11	9,05	8	7,16	9,25	8	7,45	9,34	8	7,11	9,21	28				
Levures (OGA)	1,79	2,61	4,90	18	<2,00	5,95	18	<2,00	<2,00		2,79	5,02	18	2,71	4,56	18				
Enterococcus(SB)	1,97	3,54	7,61	18	3,75	7,58	18	3,53	7,39	28	3,35	7,69	18	<2,00	<2,00					
Leuconostocs(MSE)	3,30	3,97	9,29	8	4,01	9,39	18	4,23	9,34	8	4,34	9,40	8	<2,00	<2,00					
Lactobacillus(FH)	2,89	3,91	9,91	28	3,78	8,03	18	3,88	9,07	18	3,86	8,65	28	<2,00	<2,00					
Bactéries à Gram négatif (PCA+L-I)	3,81	3,05	5,66	18	<2,00	5,25	8	<2,00	4,18	18	<1,00	4,24	18	2,79	6,45	18				
bactéries non lactiques et Enterococcus (CRBM)	2,80	3,88	7,50	18	3,86	7,52	8	3,79	7,52	18	3,48	8,45	8	3,51	6,47	18				
Staphylococcus et Corynebacterium (RPF)	2,26	2,91	5,21	18	2,09	5,63	18	2,48	4,65	18	<2,00	<2,00		2,85	5,69	1				

**Tableau 27: Résultats des dénombrements des principaux genres ou groupes microbiens sur divers milieux (cf. tableau 12).**

ni = inoculation théorique, nd(t+1h) : numérations après 1h d’incubation à 32°C et ajout du ferment  
max= niveau des populations maximal atteint, t= temps en jours pour atteindre le niveau maximal  
ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

#### **4.4.4. Résultats de la seconde série d'expérimentations**

Afin de vérifier les résultats de la première série d'essais, une deuxième série d'expériences (Figure 13) a été réalisée en répétant les fabrications avec trois combinaisons (témoin, ABCD, ABD) et en éliminant un groupe microbien à une des communautés préalablement simplifiées pour préciser certaines interactions. Nous avons choisi de simplifier la communauté ne contenant pas les bactéries à Gram négatif (ABD) car elle est aussi inhibitrice de *L. monocytogenes* que la communauté complexe (ABCD).

##### **4.4.4.1. Dynamique des populations microbiennes**

###### **4.4.4.1.1. Populations microbiennes autres que *L. monocytogenes***

Les populations ont été uniquement quantifiées par dénombrements microbiens. L'analyse SSCP des ADNr 16S extraits directement des fromages n'a pas été appliquée.

Globalement, toutes les populations microbiennes se sont mieux développées que dans la première expérimentation malgré des niveaux similaires d'ensemencement.

###### **4.4.4.1.1.1. *S. thermophilus* et les bactéries lactiques (groupe A)**

Comme dans la première expérimentation, les populations thermophiles dominées par *S. thermophilus* ont un niveau similaire dans tous les fromages (Tableau 27).

Les populations de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc* atteignent les niveaux les plus importants (>8 log UFC/g) dans les fromages fabriqués avec le groupe A des bactéries lactiques (Tableau 27). Le niveau maximal de *Lactobacillus* est atteint après 18 ou 28 jours. Il est particulièrement élevé, environ 10 log UFC/g, après 28 jours dans le fromage ABCD. Les populations d'*Enterococcus* dépassent 7,5 log UFC/g à partir de 18 jours d'affinage dans les fromages ABCD, ABD et AD et après 28 jours d'affinage dans le fromage AB.

Les *Lactobacillus*, les *Enterococcus* et les *Leuconostoc* ne sont pas dénombrés dans les fromages dans lesquels ils ne sont pasensemencés.

Ces résultats confirment le développement important des bactéries lactiques noté dans la première série d'expérimentations.

###### **4.4.4.1.1.2. Les bactéries à Gram positif non lactiques (groupe B)**

Les niveaux de flore sur le milieu CRBM des fromages ABCD, ABD, AB et BD correspondent aux dénombrements de plusieurs populations mises en évidence par analyse SSCP de l'ensemble des colonies collectées sur le milieu CRBM. Outre les bactéries à Gram positif non lactiques et les

Temps	1 jour				8 jours				18 jours				28 jours			
	ABCD	ABD	AB	AD	BD	ABCD	ABD	AD	BD	ABCD	AD	BD	ABCD	AB	AD	
Espèces																
<i>Kocuria rhizophila</i> <i>Rothia</i> sp.	10	2	26	0	0	40	0	0	98	0	0	21	100	0	0	
<i>Arthrobacter nicotianae</i> <i>Brevibacterium linens</i>	19	0	0	0	0	40	0	0	2	0	0	34	0	0	0	
<i>Corynebacterium flavesces</i> <i>Brachybacterium rhammosum</i> <i>Chryseobacterium</i> sp.	43	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Macrococcus caseolyticus</i>	11	0	67	93	0	11	0	100	97	0	21	92	0	0	100	88
<i>Exiguobacterium</i> sp. <i>Enterobacter amnigenus</i>	0	19	0	0	47	0	100	0	0	0	0	21	0	0	0	0
<i>Corynebacterium casei</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	17	79	7	0	53	9	0	0	0	54	0	24	0	0	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus farcininis</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	3	0	0	8	0	0	0	12

**Tableau 28: Ratios des pics SSCP (Pi) après amplification de la région V3 de l’ADNr 16S des colonies collectées sur le milieu CRBM dans les laits et les fromages à 1, 8, 18 et 28 jours**

P<sub>i</sub> = a<sub>i</sub> x100/Σ a<sub>i</sub> où Pi représente le ratio de chaque pic i et a<sub>i</sub> l’aire d’un pic.

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

Temps	1 jour		8 jours		28 jours
	ABD	AB	ABD	AD	
Espèces					AB
<i>Corynebacterium flavesces</i>	0	0	3	0	9
<i>Brachybacterium rhamnosum</i> <i>Chryseobacterium</i> sp.	3	0	19	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Macrococcus caseolyticus</i>	7	28	20	36	45
<i>Exiguobacterium</i> sp. <i>Enterobacter amnigenus</i>	48	0	25	0	0
<i>Corynebacterium casei</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	37	66	33	0	46
<i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus farcininis</i>	5	6	0	64	0

**Tableau 29: Ratios des pics SSCP (Pi) après amplification de la région V3 de l’ADNr 16S des colonies collectées sur le milieu PCA+Lait+ inhibiteur de bactéries à Gram positif dans les laits et les fromages à 1, 8, 18 et 28 jours**

P<sub>i</sub> = a<sub>i</sub> x100/Σ a<sub>i</sub> où Pi représente la proportion de chaque pic i et a<sub>i</sub> l’aire d’un pic.

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

*Enterococcus*, l'analyse par SSCP des colonies cultivées sur milieux CRBM révèle aussi la présence sur le milieu de *Lactobacillus* et/ou de *Leuconostoc*.

Les populations dominantes sur le milieu CRBM varient d'un fromage à l'autre et en fonction du stade d'affinage. Leur profil SSCP pour les fromages AD et AB est dominé par le pic d'*E. faecalis*, de *Ln. pseudomesenteroides* et de *Macro. caseolyticus* quel que soit le stade d'affinage (Tableau 28). Par contre, l'analyse SSCP de l'ensemble des colonies cultivées sur les milieux CRBM des fromages ABCD révèle une variation des équilibres entre les différentes populations tout au long de l'affinage. Ainsi, le pic de *Brachy. rhamnosus* et le pic de *Coryne. flavescentis* sont les pics dominants à 1 jour puis le pic KRAB devient dominant à 28 jours d'affinage. La dominance de ce pic, en fin d'affinage, confirme les résultats de la première série d'expérimentations.

Dans les fromages BD ne contenant pas les bactéries lactiques (groupe A), le niveau de bactéries à Gram positif non lactiques (groupe B) atteint son niveau maximal de 6,47 log UFC/g après 18 jours, d'après les résultats des dénombrements sur le milieu CRBM (Tableau 27).

D'après l'analyse SSCP des colonies cultivées sur le milieu CRBM, au moins 3 espèces (*Coryne. flavescentis* et *Coryne. casei* ou *Staph. equorum* ou *Staph. xylosus* et *Koc. rhizophilia* ou *Brevi. linens* ou *Arthro. nicotianae* ou *Rothia sp.*) seraient présentes à ce stade. Ce chiffre est cependant sous-estimé en raison des coélutions des séquences nucléotidiques de différentes espèces sur les profils SSCP après amplification de la région V3 de l'ADNr 16S. La présence de populations de *Coryne. casei*, *Staph. equorum* et *Staph. xylosus* détectées sur les profils SSCP des populations quantifiées sur le milieu CRBM est confirmé par les résultats des dénombrements sur le milieu RPF. Les populations de *Corynebacterium* et *Staphylococcus* sur le milieu RPF (Tableau 27) atteignent 5,69 log UFC/g dès 1 jour dans le fromage BD. Les niveaux de populations de *Corynebacterium* et de *Staphylococcus* dénombrées sur le milieu RPF sont les plus faibles dans les fromages AB (4,65 log UFC/g à 18 jours).

#### **4.4.4.1.1.3. Les bactéries à Gram négatif (groupe C)**

Dans les fromages fabriqués uniquement avec *S. thermophilus*, aucune flore n'est dénombrée sur le milieu PCA+L+I (<2 log UFC/g) ce qui indiquerait une absence de contamination. Dans tous les autres fromages, quel que soit le stade d'analyse, une flore est dénombrée sur ce milieu même dans les fromages dont le lait n'a pas été inoculé avec les bactéries à Gram négatif.

Comme indiqué dans le tableau 12 et commenté dans le paragraphe 4.4.2.1.1.1.3, les espèces *E. faecalis*, *E. hirae*, *Ln. citreum* et *Arthro. nicotianae*, sont capables de se multiplier sur ce milieu. Leur présence a été confirmée par l'analyse SSCP des populations présentes sur PCA+L+I du fromage AB (bactéries lactiques et bactéries non lactiques à Gram positif) à 1 et 28 jours pour lesquels les profils comprennent 2 pics : l'un des pics correspond à *E. faecalis*, *Ln. pseudomesenteroides* *Macro. caseolyticus* et l'autre correspond à une ou plusieurs des espèces suivantes, *Coryne. casei*, *Staph. equorum* et *Staph. xylosus* (Tableau 29). Ces pics sont également présents sur les profils SSCP des



Fromages	Analyse	Stade de prélèvement (jours)	<i>C. pseudointermedia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>Debaryo. hansenii</i>	<i>C. pararugosa</i>	<i>Rhodo. babjevae</i>
AD	SSCP boîte	1	98	2	0	0	0
AD	Colonies	1	15		19	65	1
AD	SSCP boîte	8	100	0	0	0	0
AD	Colonies	8	75		22	0	1
AD	SSCP boîte	18	89	2	0	2	7
AD	Colonies	18	36		60	1	3
AD	SSCP boîte	28	100	0	0	0	0
AD	Colonies	28	0		6	94	0
BD	SSCP boîte	1	99	0	0	0	1
BD	Colonies	1	6		4	84	6
BD	SSCP boîte	8	89	4	0	1	2
BD	Colonies	8	85		15	0	0
BD	SSCP boîte	18	NA	NA	NA	NA	NA
BD	Colonies	18	69		30	0	1
BD	SSCP boîte	28	73	0	0	0	27
BD	Colonies	28	45		2	53	0
ABD	SSCP boîte	1	100	0	0	0	0
ABD	Colonies	1	5		7	83	5
ABD	SSCP boîte	8	95	1	0	0	4
ABD	Colonies	8	77		21	0	2
ABD	SSCP boîte	18	73	7			20
ABD	Colonies	18	34		66	0	0
ABD	SSCP boîte	28	100	0	0	0	0
ABD	Colonies	28	0		8	92	0
ABCD	SSCP boîte	1	83	0	0	17	0
ABCD	Colonies	1	12		14	72	2
ABCD	SSCP boîte	8	60	3	25	12	0
ABCD	Colonies	8	87		7	0	6
ABCD	SSCP boîte	18	80	4	0	16	0
ABCD	Colonies	18	85		10	5	0
ABCD	SSCP boîte	28	80	0	1	19	0
ABCD	Colonies	28	25		15	60	0

**Tableau 31 : Comparaison des ratios des pics profils SSCP des colonies collectées sur le milieu OGA et pourcentage des différents types de colonies dénombrées sur le milieu OGA**

SSCP : ratios des pics des profils SSCP après amplification de l'ADNr18S des colonies collectées sur le milieu OGA

Colonies : proportions des différents types de colonies qui se sont développées sur le milieu OGA.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions (3 milieux OGA inoculés avec la même dilution)

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

Fromages	<i>L. monocytogenes</i> 1-6j	<i>L. monocytogenes</i> 8-28j	<i>L. monocytogenes</i> 1-28j
ABCD	1,30 a	0,77 a	0,99 a
ABD	1,57 ab	0,91a	0,93a
AB	1,69 ab	1,07a	1,19a
AD	1,81 ab	1,81b	1,81b
BD	1,97 ab	2,30 b	2,35b
contrôle	2,06 b	2,45 b	2,25b

**Tableau 32 : Niveau de *L. monocytogenes* dans les fromages.**

Les résultats sont la moyenne des différences de numération (LogNt-LogN<sub>0</sub>) des fromages entre 1-6 jours et 8-28 jours. Nt=UFC/g au temps t, t= temps en jours; N<sub>0</sub>= UFC/ml X10

p = niveau de significativité, NS : non significatif, \* = p<0,05

Dans la même colonne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls à p<0,05.

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

Fromages	pH 1-6j	pH 8-28j	ES 1-6j	ES 8-28j
ABCD	5,33 NS	5,30 NS	46,49a	48,86 NS
ABD	5,42 NS	5,32 NS	47,62ab	48,33 NS
AB	5,37 NS	5,33 NS	48,70 b	48,85 NS
AD	5,42 NS	5,32 NS	48,06 ab	47,20 NS
BD	5,46 NS	5,32 NS	49,36 b	47,20 NS
Contrôle	5,34 NS	5,31 NS	48,11ab	48,46 NS

**Tableau 33 : Valeurs de pH et d'extrait sec (ES) des fromages entre 1 et 6 jours et 8 et 28 jours.**

NS : non significatif. Dans la même colonne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls à p<0,05.

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

colonies collectées sur le milieu PCA+L+I du fromage ABD à 1 et 8 jours. Sur ces profils, ont également été détectés, le pic assigné à *Brachy. rhamnosus* et *Chryseo. sp.*, le pic correspondant à *Exigu. sp.* et *Enterob. amnigenus* et le pic de *Lb. curvatus*, *Ln. citreum* et *Lb. farciminis* correspondant probablement à *Ln. citreum*.

Ce dernier exemple montre que les flores dénombrées sur le milieu PCA+L+I peuvent aussi inclure des bactéries à Gram positif. Sur la base de ces constatations, comme dans la première série d'expérimentations, il n'est pas possible de quantifier le niveau des bactéries à Gram négatif de ces fromages pour évaluer d'éventuelles contaminations.

#### 4.4.4.1.1.4. Les levures

Dans tous les fromages, la population de levure maximale est atteinte après 18 jours. Elle a le niveau le plus fort (5,95 log UFC/g) dans les fromages ABD (Tableau 27) et le plus faible (4,56 log UFC/g) dans les fromages BD fabriqués sans le groupe A des bactéries lactiques.

L'analyse des profils SSCP des colonies collectées sur le milieu OGA, révèle une dominance de *C. pseudointermedia* pour tous les milieux quel que soit le fromage analysé ou le temps de prélèvement des fromages (Tableau 31). Le profil des populations de levures présentes sur le milieu OGA du fromage ABCD est légèrement différent des autres avec la présence du pic correspondant à *C. pararugosa* (de 12 à 19%).

Par contre, la quantification des espèces par comptage des colonies révèle des variations en fonction du temps d'affinage et des fromages analysés. Ainsi, à 1 jour, dans tous les fromages préparés avec le groupe des levures, les 4 espèces de levures sont quantifiées avec une dominance de l'espèce *C. pararugosa* (3,39 à 3,79 log UFC/g soit 65 à 84% de la totalité des colonies qui se sont multipliées sur le milieu OGA) et la présence de *C. pseudointermedia* et/ou *Y. lipolytica* (2,31 log UFC/g et 3,17 log UFC/g) et *Debaryo. hansenii* (entre 2,31 et 3,26 log UFC/g) (Tableau 30).

A 8 et 18 jours, *C. pararugosa* devient sous-dominant alors que *C. pseudointermedia* et/ou *Y. lipolytica* devient majoritaire (entre 3,67 et 5,48 log UFC/g selon les fromages). A 18 jours, dans le fromage ABD, *Debaryo. hansenii* est aussi quantitativement important que *C. pseudointermedia* et/ou *Y. lipolytica* mais son pic n'est pas détecté sur les profils SSCP des colonies collectées sur le milieu OGA.

A 28 jours, *C. pararugosa* (entre 3,34 et 3,93 log UFC/g) et *Debaryo. hansenii* (entre 2,48 et 2,73 log UFC/g) sont les espèces majoritairement dénombrées dans les fromages AD et ABD tandis que *C. pseudointermedia* et/ou *Y. lipolytica* sont aussi quantifiées à 3,86 log UFC/g sur le milieu correspondant au fromage BD et à 2,97 log UFC/g dans le fromage ABCD. *Rhodo. babjevae* n'est jamais quantifiée à 28 jours. Par contre, l'analyse SSCP des colonies quantifiées sur milieu OGA du fromage BD génère un profil dans lequel un pic correspondant à cette espèce est détecté.



	L lactate	D-lactate
AB	7,05	1,14
AD	6,66	1,15
BD	6,22	0,71
ABD	6,96	1,51
ABCD	7,90	0,60
control	6,95	0,02
p	NS	NS

**Tableau 34 : Teneurs moyennes (mg/g) en acides organiques dans les fromages.**

Les D et L-lactate ont été dosés par méthode enzymatique,

Les valeurs sont les moyennes des teneurs à tous les temps d'analyse

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

p = niveau de significativité, NS: non significatif selon le test statistique de Newman-Keuls à  $p < 0,05$ .

	Acide acétique					Acide butyrique					Acide caproïque				
	1j	15j	22j	28j	moy	1j	15j	22j	28j	moy	1j	15j	22j	28j	moy
AB	0,0	655	892	979	842 NS	0,8	4,9	8,2	10,0	6,0 NS	1,0	4,7	5,6	4,1	3,9 NS
AD	0,0	510	702	534	752 NS	0,9	4,8	8,9	4,6	4,8 NS	1,0	2,3	7,0	2,0	3,1 NS
BD	0,0	87	185	175	149 NS	0,0	2,7	7,6	8,2	4,6 NS	0,8	2,2	4,7	4,4	3,0 NS
ABD	0,0	417	452	634	501 NS	0,9	5,8	5,3	8,4	5,1 NS	0,4	5,5	2,7	3,3	3,0 NS
ABCD	0,0	0,0	467	703	390 NS	0,1	5,5	7,9	6,9	5,1 NS	0,9	3,5	4,0	3,6	3,0 NS
contrôle	0,0	210	0	74	94NS	0,1	7,1	2,2	4,1	3,4 NS	9,4	7,7	1,7	3,3	5,5 NS

**Tableau 35 : Teneurs en acides acétique, butyrique, et caproïque (mg/kg) dans les fromages.**

Les teneurs en acides acétique et butyrique ont été dosés par SPME-CPG. Pour l'acide acétique, la moyenne représente la moyenne des valeurs entre 1 et 28 jours.

j : jours ; NS : non significatif à  $p < 0,05$

Les moyennes sont les moyennes des teneurs à tous les temps d'analyse

Nous confirmons que les résultats de quantification des populations par aspect des colonies ou par analyse des profils SSCP peuvent conduire à des conclusions divergentes sur les équilibres des populations de levures dans les fromages. Les raisons de ces divergences ont été évoquées dans le paragraphe 4.4.2.1.1.1 4.

#### **4.4.4.2. Effet des ensemencements sur le développement de *L. monocytogenes***

Les résultats des dénombrements en *L. monocytogenes* sont présentés dans le tableau 32.

Cette deuxième série d'expérimentations confirme les résultats de la première. En effet aucune inhibition n'est notée jusqu'à 6 jours. Le niveau de *L. monocytogenes* est similaire à celui de la première série d'expérimentations.

Entre 8 et 28 jours, comme dans la première série d'expérimentations, la plus forte inhibition ( $\Delta \log$  UFC/g de croissance  $< 1,5$  Log par rapport au développement dans les fromages avec *S. thermophilus*) est notée dans les fromages fabriqués avec la communauté complexe ABCD et dans ceux fabriqués avec les communautés ABD ou AB.

Par contre, l'association des bactéries lactiques et levures (AD) est moins inhibitrice que celle contenant les bactéries d'affinage (AB). Une communauté microbienne sans bactéries lactiques mais associant bactéries d'affinage et levures (BD) n'est plus inhibitrice et le développement de *L. monocytogenes* dans ces fromages est similaire à celui noté dans le fromage témoin fabriqué avec uniquement *S. thermophilus*.

#### **4.4.4.3. Evolution des paramètres physico-chimiques**

##### **4.4.4.3.1. pH**

Les valeurs de pH ne sont pas significativement différentes entre des fromages fabriqués avec des combinaisons microbiennes différentes. Les écarts entre ces valeurs sont inférieurs à 0,1 unités de pH. En cours d'affinage le pH évolue peu ( $\Delta \text{pH} < 0,1$  u) et la présence de bactéries lactiques autres que *S. thermophilus* n'entraîne pas de diminution des valeurs de pH des fromages (Tableau 33). Ces données corroborent celle de la première série d'expérimentations même si les valeurs de pH entre 8 et 28 jours sont supérieures de 0,1 unité à ceux de la première série d'expérimentations.

##### **4.4.4.3.2. Extraits secs**

Les extraits secs des fromages sont présentés dans le tableau 33. Entre 1 et 6 jours, les fromages fabriqués avec le cocktail des 4 groupes microbiens ont des valeurs d'extraits secs significativement les plus faibles contrairement aux résultats de la première série d'expérimentations et les fromages AB

familles	molécules	AB	AD	ABD	ABCD	BD	control	p
Aldéhydes	butanal	4,41	4,58	4,50	4,47	4,81	4,89	NS
	2-méthyl-propanal	4,77 a	4,83 a	4,83 a	4,76 a	5,05 a	<b>5,74 b</b>	*
	3-méthyl-butanal	4,52	4,48	4,62	4,42	4,72	4,59	NS
	2-méthyl-butanal	4,13	4,05	4,32	4,12	4,44	4,48	NS
Alcools	1-pentanol	6,00 b	5,97 b	5,86 ab	5,81 ab	5,83 ab	<b>5,69 a</b>	*
	2-propanol	5,62	7,62	5,58	7,63	5,37	7,42	NS
	2-butanol	5,64 b	5,50 b	5,66 b	5,63 b	<b>4,45 ab</b>	<b>4,26 a</b>	*
	2-pentanol	5,70 b	5,54 b	5,83 b	5,70 b	<b>2,62 a</b>	<b>3,86 ab</b>	*
	2-heptanol	4,54	4,53	4,19	4,86	3,42	2,37	NS
	2-méthyl-1-propanol	5,55	5,49	5,56	5,52	5,72	5,54	NS
	3-méthyl-1-butanol	5,83	5,66	6,06	5,93	6,32	5,82	NS
	2-méthyl-1-butanol	5,23	5,32	5,38	5,19	5,44	5,26	NS
Cétones	2-hexanone	3,61 ab	3,49 ab	2,92 a	3,95 ab	3,87 ab	4,37 b	*
	3-méthyl-2-butanone	3,75 b	2,24 a	2,21 a	2,95 ab	4,00 b	4,04 b	*
	2-propanone	6,68	6,73	6,66	6,55	7,10	7,09	NS
	2-butanone	6,12	6,21	6,07	6,55	6,53	7,09	NS
	4-méthyl-2-pentanone	3,83	3,88	3,50	3,74	4,34	4,33	NS
	2,3-butanedione	6,98	7,06	6,93	6,86	7,69	7,70	NS
	2,3-pentanedione	5,45	5,59	5,48	5,50	6,11	6,16	NS
Esters	éthyl formiate	4,43 b	4,39 b	4,55 b	4,49 b	<b>3,75 a</b>	<b>3,72 a</b>	*
	éthyl acétate	6,23 b	6,19 b	6,22 b	6,12 b	6,07 b	<b>5,82 a</b>	*
	éthyl butanoate	5,45	5,50	5,46	5,41	4,99	5,01	NS
	éthyl hexanoate	4,49	4,18	4,43	4,35	3,97	3,86	NS
Furanes	2-éthyl-furane	4,92	4,88	4,88	4,97	4,73	4,97	NS
	2-pentyl-furane	4,50	4,46	4,53	4,53	4,50	4,43	NS
Dérivés benzéniques	styrène	5,65	5,76	5,72	5,49	5,72	5,83	NS
	1,2-diméthyl benzène	5,27 ab	5,28 ab	5,41 b	5,25 ab	5,36 ab	<b>5,20 a</b>	*
Terpène	dl limonène	4,79 ab	4,83 ab	5,00 b	4,74 a	4,84 ab	4,65 a	*
	alpha terpinolène	3,96 ab	3,99 ab	4,20 b	3,88 a	4,09 ab	3,96 ab	*
	1ME-4-M benzene	3,90 ab	3,94 ab	4,07 b	3,69 ab	3,77 ab	<b>3,44 a</b>	*
	chloroforme	6,33 bc	6,30 abc	6,26 ac	6,36 bc	6,21 a	6,39 b	*
	tétrachlorométhane	4,29	4,25	4,14	4,19	4,05	4,13	NS

**Tableau 36 : Teneurs moyennes composés volatils dans les fromages.**

NS : non significatif. Sur une même ligne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls à p<0,05.

ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

et BD ont les valeurs d'extraits les plus importants. Entre 8 et 28 jours, les valeurs d'extrait sec ne sont plus significativement différentes.

#### **4.4.4.4. Comparaison des teneurs en acides et composés volatils**

##### **4.4.4.4.1. Analyse des acides**

Les acides 2-méthyl butyrique, 3-méthyl butyrique et valérique ne sont soit jamais détectés dans les fromages, soit le sont à des concentrations très faibles (inférieures à 2mg/kg), soit à l'état de traces.

Les teneurs en acides lactiques L et D des fromages ne sont pas significativement différentes (Tableau 34). Cependant, comme dans la première série d'expérimentations, l'acide lactique D est surtout produit dans les fromages fabriqués avec une communauté comprenant le groupe des bactéries lactiques (Tableau 35).

L'acide acétique est également en plus faible quantité dans les fromages fabriqués avec uniquement *S. thermophilus* et dans le fromage fabriqué sans les bactéries lactiques (groupe A) et est essentiellement produit en cours d'affinage comme dans la première série d'expérimentations. L'acide butyrique, produit en cours d'affinage, est le plus faiblement détecté dans les fromages avec uniquement *S. thermophilus* alors qu'au contraire l'acide caproïque y est détecté en plus fortes concentrations. Les teneurs en acide caproïque augmentent en cours d'affinage dans tous les fromages à l'exception du fromage fabriqué avec uniquement *S. thermophilus* où elles diminuent.

##### **4.4.4.4.2. Analyse des composés volatils**

Les mêmes composés volatils que dans la première série d'expérimentations ont été détectés. Les données ont été analysées comme dans la première série d'expérimentations.

Les résultats confirment que les teneurs globales en composés volatils et leur évolution en cours du temps varient d'un fromage à l'autre.

Ainsi, les fromages préparés avec les bactéries lactiques (groupe A) même en l'absence des bactéries à Gram négatif (groupe C) contiennent les plus fortes teneurs en alcools (2-butanol, 2-pentanol) et en éthyl formiate et les plus faibles teneurs en aldéhydes (butanal, 2-méthyl-propanal et 2-méthyl-butanal) et cétones (4-méthyl-2-pentanone, 2,3-butanedione et 2,3 pentanedione) malgré des différences moins importantes que dans la première série d'expérimentations (Tableau 36).

L'éthyl formiate est essentiellement produit jusqu'à 15 jours (Tableau 37) dans les fromages fabriqués avec les bactéries lactiques (groupe A). Sa production continue jusqu'à 22 jours dans les fromages fabriqués avec les bactéries lactiques (groupe A) et les levures (groupe D).

Par contre, les teneurs en furanes ne distinguent plus les fromages alors que les teneurs en éthyl acétate distinguent les fromages fabriqués avec *S. thermophilus* dans lesquels elles sont les plus faibles.

	molécules	15-1						22-15						28-22						
		AB	AD	ABD	ABCD	BD	contrôle	AB	AD	ABD	ABCD	BD	contrôle	AB	AD	ABD	ABCD	BD	contrôle	
Aldéhydes	propanal	0,02	-0,61	0,00	-0,49	0,08	-0,15	0,23	0,62	-0,11	-0,10	0,05	-0,06	-0,29	-0,53	0,09	0,69	-0,01	0,13	
	<b>butanal</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,36</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,37</b>	<b>0,20</b>	<b>0,16</b>	<b>-0,14</b>	<b>0,21</b>	<b>0,31</b>	<b>0,19</b>	<b>-0,08</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,39</b>	<b>-0,09</b>	<b>-0,06</b>	<b>-0,18</b>	
	pentanal	-0,10	-0,02	-0,21	0,05	0,68	0,42	0,09	-0,03	0,41	0,15	0,07	-0,02	-0,20	-0,23	-0,54	0,05	-0,12	-0,35	
	hexanal	-0,14	-0,03	-0,24	0,10	0,52	0,20	-0,01	-0,14	0,10	0,11	0,02	-0,18	-0,32	-0,21	-0,55	-0,27	-0,16	-0,19	
	octanal	0,13	0,29	0,18	0,01	0,63	-0,10	-0,02	-0,32	-0,20	0,00	-0,33	0,06	-0,35	-0,11	-0,36	-0,14	0,19	-0,17	
	<b>2-méthyl-propanal</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,44</b>	<b>0,12</b>	<b>0,76</b>	<b>0,11</b>	<b>-0,16</b>	<b>0,33</b>	<b>0,11</b>	<b>0,05</b>	<b>-0,04</b>	<b>-0,23</b>	<b>-0,07</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	
	3-méthyl-1-butanol	-0,02	0,45	-0,35	0,08	0,34	1,06	0,14	-0,18	0,25	0,07	-0,45	-0,47	-0,09	0,16	-0,20	0,15	0,44	0,16	
	2-méthyl-1-butanol	-0,34	0,13	-0,42	-0,33	0,02	0,39	0,31	0,00	-0,35	0,19	-0,28	-0,02	-0,50	-0,07	0,31	0,06	0,37	0,20	
	benzaldehyde	-0,02	0,10	0,05	0,09	0,33	0,33	-0,24	0,03	0,14	-0,14	-0,31	0,28	0,12	-0,26	-0,24	-0,01	0,43	-0,38	
	Alcools	éthanol	0,04	0,19	-0,10	-0,19	-0,12	0,13	0,12	0,02	0,14	0,01	0,04	0,20	0,01	0,05	-0,13	0,00	-0,02	-0,27
<b>1-pentanol</b>		<b>0,09</b>	<b>0,15</b>	<b>-0,03</b>	<b>-0,06</b>	<b>0,13</b>	<b>-0,25</b>	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>0,12</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,01</b>	<b>0,12</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,23</b>	
2-propanol		-0,29	-0,05	-0,42	-0,57	-0,12	0,06	0,29	0,41	0,25	0,05	-0,13	-0,05	0,18	0,04	-0,01	0,30	0,01	0,12	
<b>2-butanol</b>		<b>1,17</b>	<b>1,64</b>	<b>1,25</b>	<b>1,17</b>	<b>0,47</b>	<b>0,95</b>	<b>-0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>-0,07</b>	<b>0,06</b>	<b>0,10</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,10</b>	<b>0,07</b>	<b>0,07</b>	
<b>2-pentanol</b>		<b>1,75</b>	<b>2,14</b>	<b>1,19</b>	<b>1,56</b>	<b>1,86</b>	<b>1,46</b>	<b>0,26</b>	<b>0,46</b>	<b>0,46</b>	<b>0,35</b>	<b>-2,17</b>	<b>-0,63</b>	<b>0,31</b>	<b>0,00</b>	<b>0,31</b>	<b>0,29</b>	<b>0,00</b>	<b>0,17</b>	
<b>2-heptanol</b>		<b>3,17</b>	<b>3,20</b>	<b>1,67</b>	<b>1,72</b>	<b>2,06</b>	<b>0,00</b>	<b>0,18</b>	<b>0,20</b>	<b>0,28</b>	<b>0,20</b>	<b>-0,48</b>	<b>0,00</b>	<b>0,29</b>	<b>0,14</b>	<b>0,26</b>	<b>0,29</b>	<b>0,50</b>	<b>1,50</b>	
2-méthyl-1-propanol		-0,08	0,20	-0,83	-0,51	-0,21	0,25	0,00	0,10	0,19	0,17	0,14	0,21	0,20	0,15	0,14	0,10	0,06	-0,05	
<b>3-méthyl-1-butanol</b>		<b>-0,19</b>	<b>0,42</b>	<b>-0,65</b>	<b>0,45</b>	<b>-0,08</b>	<b>0,33</b>	<b>0,57</b>	<b>0,15</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,21</b>	<b>0,21</b>	<b>0,19</b>	<b>0,00</b>	<b>0,49</b>	<b>0,34</b>	<b>0,13</b>	<b>0,03</b>	<b>0,31</b>	
2-méthyl-1-butanol		-0,22	0,47	-1,30	-0,02	-0,50	-0,32	-0,16	0,00	-0,36	0,21	-0,51	0,36	0,38	0,53	0,52	0,11	0,45	0,63	
3-méthyl-2-butanol		0,17	0,59	-0,04	0,63	0,49	1,36	0,31	0,26	0,42	0,04	0,29	-0,07	0,67	0,30	-0,22	0,17	0,41	-0,09	
Cétones	<b>butanediol?</b>	<b>2,81</b>	<b>3,18</b>	<b>0,10</b>	<b>0,93</b>	<b>3,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,02</b>	<b>2,75</b>	<b>-0,19</b>	<b>0,00</b>	<b>-2,94</b>	<b>-0,35</b>	<b>0,18</b>	<b>0,24</b>	
	<b>2-propanone</b>	<b>-1,33</b>	<b>-1,07</b>	<b>-0,96</b>	<b>-1,40</b>	<b>-0,20</b>	<b>-0,07</b>	<b>0,66</b>	<b>0,37</b>	<b>0,19</b>	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>-0,13</b>	<b>0,17</b>	<b>0,21</b>	<b>0,10</b>	<b>0,59</b>	<b>-0,11</b>	<b>-0,10</b>	
	<b>2-butanone</b>	<b>-1,02</b>	<b>-0,58</b>	<b>-0,82</b>	<b>-1,09</b>	<b>-0,14</b>	<b>-0,07</b>	<b>0,05</b>	<b>-0,35</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,18</b>	<b>0,12</b>	<b>0,23</b>	<b>0,15</b>	<b>0,16</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,16</b>	
	2-pentanone	-0,19	0,10	-0,13	-0,25	0,09	0,07	0,43	0,22	0,28	0,48	0,11	0,72	0,48	0,32	0,36	0,41	-0,08	-0,05	
	2-hexanone	-0,05	0,29	-1,47	-0,71	0,80	-0,08	-0,63	-0,76	-0,13	1,80	-0,18	0,83	0,09	0,52	0,60	-1,58	0,05	-0,18	
	4-méthyl-2-pentanone	-0,84	-0,50	-0,75	-0,95	0,06	-0,06	-0,01	-0,21	-0,10	-0,03	0,04	0,04	-0,04	0,02	-1,26	0,04	0,12	-0,10	
	<b>2,3-butanedione</b>	<b>-1,12</b>	<b>-0,76</b>	<b>-0,70</b>	<b>-1,55</b>	<b>0,01</b>	<b>0,08</b>	<b>0,28</b>	<b>-0,22</b>	<b>-0,27</b>	<b>0,66</b>	<b>0,22</b>	<b>0,00</b>	<b>0,14</b>	<b>0,30</b>	<b>0,11</b>	<b>0,28</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,09</b>	
	<b>2,3-pentanedione</b>	<b>-1,06</b>	<b>-0,68</b>	<b>-0,78</b>	<b>-1,25</b>	<b>0,01</b>	<b>-0,14</b>	<b>0,19</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,12</b>	<b>0,55</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,17</b>	<b>-0,05</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,06</b>	
	3-hydroxy-2-butanone	1,47	0,00	-3,05	0,00	3,89	0,00	-1,47	0,00	0,00	0,00	-0,97	3,15	0,00	0,00	0,00	2,27	0,65	-0,17	
	Esters	<b>éthyl formiate?</b>	<b>0,66</b>	<b>0,80</b>	<b>0,53</b>	<b>0,41</b>	<b>0,16</b>	<b>-0,23</b>	<b>-0,10</b>	<b>0,57</b>	<b>0,09</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,59</b>	<b>0,00</b>	<b>0,16</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,09</b>	<b>0,31</b>	<b>0,11</b>	<b>0,09</b>
<b>éthyl butanoate</b>		<b>0,63</b>	<b>1,00</b>	<b>0,20</b>	<b>0,35</b>	<b>0,02</b>	<b>0,42</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,03</b>	<b>0,16</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,05</b>	<b>-0,04</b>	<b>0,13</b>	<b>-0,01</b>	<b>0,14</b>	<b>0,11</b>	<b>0,10</b>	<b>-0,05</b>	
<b>éthyl hexanoate</b>		<b>0,39</b>	<b>1,77</b>	<b>0,10</b>	<b>0,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,74</b>	<b>-0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,17</b>	<b>0,02</b>	<b>-0,27</b>	<b>-0,02</b>	<b>0,18</b>	<b>0,03</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,28</b>	<b>0,19</b>	
<b>éthyl acétate</b>		<b>0,04</b>	<b>0,40</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,14</b>	<b>-0,25</b>	<b>-0,03</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,04</b>	<b>-0,16</b>	<b>0,13</b>	<b>0,08</b>	<b>-0,13</b>	<b>0,16</b>	<b>-0,06</b>	<b>-0,08</b>	<b>0,14</b>	<b>0,08</b>	<b>0,11</b>	
méthanthiol		2,54	0,30	0,30	-0,47	0,67	0,55	-0,78	-0,43	0,45	0,65	-0,32	0,18	0,21	0,04	-0,51	0,33	0,04	-0,20	
diméthyl sulfide		-0,08	-0,18	0,19	-0,07	-0,83	0,40	-0,10	0,47	0,28	0,23	1,34	-0,18	0,40	-0,05	0,09	0,05	-0,21	-0,16	
carbon disulfide		0,85	0,84	0,26	0,60	0,37	0,33	-0,50	-0,02	0,24	-0,08	0,49	0,04	0,65	-0,17	0,78	0,07	-0,23	-0,10	
2-éthyl furane		0,18	0,40	0,04	-0,04	0,20	-0,32	-0,31	-0,20	-0,14	0,00	-0,25	0,02	0,07	0,11	0,00	-0,03	0,12	0,01	
2-pentyl-furane		0,15	0,19	0,11	0,02	0,53	-0,21	-0,07	-0,14	0,01	0,08	-0,38	0,09	-0,27	-0,04	-0,27	-0,21	0,25	-0,11	
Éthers		diéthyl éther	-0,40	-0,42	-0,47	-1,11	0,42	-0,57	0,49	0,49	0,28	0,03	0,13	0,46	0,10	-0,05	-0,31	1,56	-0,48	0,65
	décane	0,19	0,36	0,87	0,39	1,40	-0,14	0,68	0,45	-1,22	0,11	-0,89	0,49	-0,66	-0,36	0,11	-0,48	0,26	-0,26	
	Alcènes	2-butène E	1,03	0,73	0,51	0,07	0,35	0,07	-0,91	-0,72	-0,26	-0,07	0,26	0,47	-0,13	-0,03	-0,05	0,51	-0,62	-0,57
		2-méthyl-1,3-butadiène	-0,38	-0,23	-0,03	-0,39	0,10	0,24	0,48	-0,40	0,27	0,12	0,16	-0,09	0,10	0,15	-0,07	0,36	-0,12	-0,08
	Dérivés benzéniques	styrène	-0,14	-0,23	-0,54	0,01	-0,06	-0,28	0,07	0,03	0,43	0,37	0,56	0,05	-0,43	-0,47	-0,61	-0,18	0,01	-0,15
		alpha-pinène	0,84	1,50	0,27	0,23	0,28	-0,49	-0,30	-0,02	-0,07	-0,20	-0,12	0,35	-0,06	-0,15	-0,19	-0,17	-0,01	-0,34
	Dérivés chlorés	tétrachlorométhane	0,06	0,05	0,11	0,09	0,04	-0,03	0,47	0,04	0,26	0,04	0,08	0,18	-0,48	0,19	-0,14	-0,05	0,00	-0,29
		benzenenitrile	-0,11	0,21	0,11	0,46	0,22	0,46	-0,52	0,32	-0,09	-0,46	-0,20	-0,46	0,50	-0,45	0,05	0,05	0,07	-0,12
	Dérivés nitrogenés																			

**Tableau 37 : Production à chaque temps (différences des teneurs entre 15 et 1 jour, entre 22 et 15 jours et entre 28 et 22 jours) des différents composés volatils.**  
ABCD, ABD, AB, AD et BD : fromages au lait pasteurisé inoculé avec des combinaisons microbiennes plus ou complexes avec A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, D : levures

	<i>L. monocytogenes</i> 1-6 j	<i>L. monocytogenes</i> 8-28 j
ABCD2	1.38 NS	0,87 a
ABD2	1.35 NS	0,91 a
AB	1.36 NS	1,15 a
AD	1.48 NS	1,72 b
BD	1.68 NS	2,25 c
contrôle	1.59 NS	2,35 c

**Tableau 38 : Niveaux de *L. monocytogenes* dans les fromages**

Les résultats sont la moyenne des deux séries d'essais en considérant que AD (2) =ADC (1); AB (2)= ABC, BD(2)=BDC (1)  
Les résultats sont la moyenne des différences de numération (LogNt-LogN<sub>0</sub>) des fromages entre 1 et 6 jours et 8 et 28 jours.

Nt=UFC/g au temps t, N<sub>0</sub>= UFC/ml X10

NS : non significatif. Dans une même colonne, les lettres a, b et c indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a<b<c). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls à p<0,05.

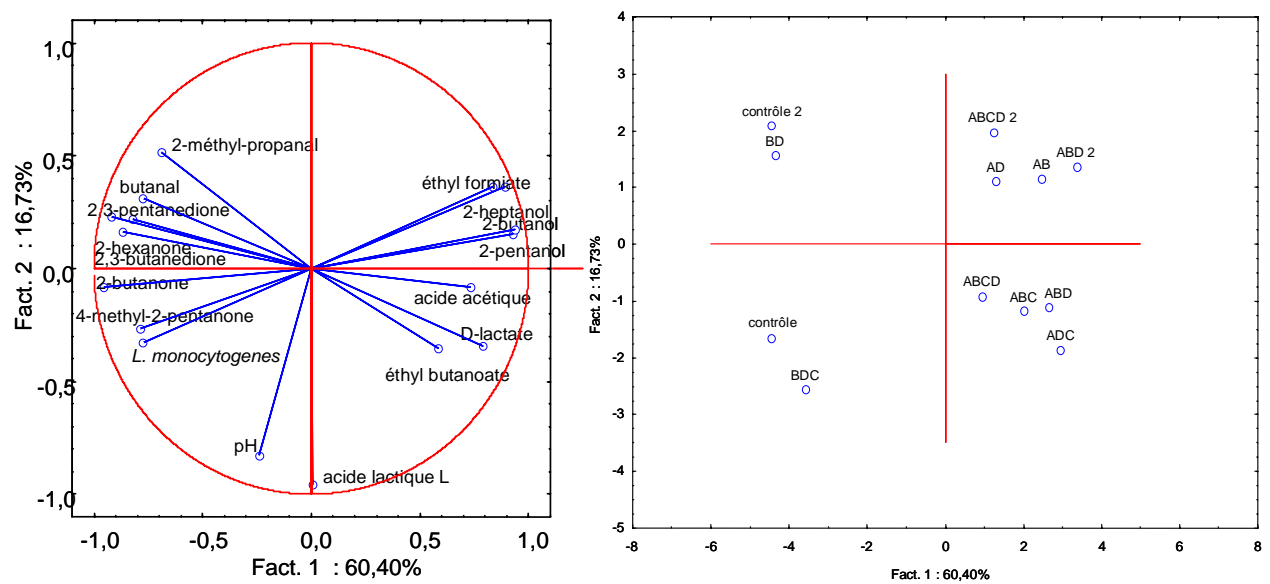
A : bactéries lactiques ; B : bactéries à Gram positif non lactiques, C : bactéries à Gram négatif, D : levures

Fromages	essais	<i>L. monocytogenes</i>
ABCD2	2r	0,93a
ABD2	1r	0,97a
ABD2	2r	0,99a
ABCD2	1r	1,01a
AB	2r	1,19ab
ABC	1r	1,20ab
ADC	1r	1,55abc
AD	2r	1,81bcd
BDC	1r	1,91cd
LP2	1r	2,10cd
LP2	2r	2,25d
BD	2r	2,35d

**Tableau 39 : Niveaux de *L. monocytogenes* dans les fromages exprimé comme décrit dans le tableau précédent.**

1r : première série d'expérimentation

2r : seconde série d'expérimentations



Comme dans la première série d'expérimentations, les alcools sont produits en début d'affinage (entre 1 et 15 jours). Le 2-pentanol et le 2-heptanol sont détectés dans les fromages BD avec une production les 15 premiers jours. Les teneurs en aldéhydes diminuent en début d'affinage pour augmenter ensuite dans les fromages contenant les bactéries lactiques (groupe A).

L'éthyl butanoate et l'éthyl hexanoate sont globalement produits en quantité plus importante dans les fromages AD fabriqués avec les bactéries lactiques (groupe A) et les levures (groupe D). Leur production est assez similaire dans tous les autres fromages et est la plus faible dans les fromages BD fabriqués avec les bactéries à Gram positif non lactiques (groupe B) et les levures (groupe D).

#### **4.4.5. Synthèse des résultats des deux expérimentations sur la croissance de *L. monocytogenes***

##### **4.4.5.1. Croissance de *L. monocytogenes***

Les données des deux séries d'essais ont été moyennées (Tableau 38) en assimilant AB de la seconde série d'expérimentations à ABC de la première série d'expérimentations, AD à ADC et BD à BDC. Les résultats de l'analyse de variance montrent que la croissance de *L. monocytogenes* est inhibée après 8 jours dans les fromages contenant le groupe des bactéries lactiques (groupe A) avec un effet synergique des bactéries à Gram positif non lactiques (groupe B) et dans une moindre mesure des levures (groupe D). Cependant, en absence des bactéries lactiques (groupe A), ces deux groupes (B et D), ne sont pas capables d'inhiber *L. monocytogenes*. L'absence de différence de niveau de *L. monocytogenes* entre les fromages AD et ADC d'une part et les fromages AB et ABC d'autre part confirme que les bactéries à Gram négatif (groupe C) n'ont aucun rôle dans l'inhibition de *L. monocytogenes* (Tableau 39). Il semblerait cependant que la présence des bactéries à Gram négatif (groupe C) avec le groupe des bactéries à Gram positif non lactiques et les levures (fromage BDC) diminue le niveau de *L. monocytogenes*.

##### **4.4.5.2. Relation *L. monocytogenes*-composition de la communauté – métabolites**

L'inhibition par les bactéries lactiques est à mettre en relation avec la dominance des populations de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Enterococcus* tout au long de l'affinage.

Elle est aussi associée à la production ou à la consommation de métabolites comme le montre l'ACP de la figure 18. Les variables (pH, niveaux de *L. monocytogenes*, teneurs en acide lactique D, en acide lactique L, en acide acétique ainsi que les teneurs en certains composés volatils des fromages à 28 jours) ont été projetées sur les axes 1 et 2 expliquant plus de 76% de la variance.

L'inhibition de *L. monocytogenes* serait ainsi positivement corrélée aux teneurs en acide acétique, en acide lactique D, 2-butanol, 2-pentanol, 2-heptanol, éthyl formiate et éthyl butanoate et négativement à



Famille	Composé	Origine	microorganismes impliqués
<b>Aldéhydes</b>			
	butanal		
	3-méthyl butanal		
	2-méthyl propanal	catabolisme de la valine	<i>Lb. paracasei, Lb. plantarum</i>
<b>Alcools</b>			
	1-pentanol	oxydation des acides gras	Réduction des cétones
	2-propanol	oxydation des acides gras	
	2-butanol	oxydation des acides gras	
	2-heptanol	oxydation des acides gras	
	2-pentanol	oxydation des acides gras	
	2-méthyl-1-propanol	catabolisme valine	<i>Lb. paracasei, Lb. plantarum</i>
	3-méthyl-1-butanol	catabolisme leucine	<i>Enterococcus</i>
	2-méthyl-1-butanol	catabolisme isoleucine	
<b>Cétones</b>			
	2-hexanone	oxydation des acides gras	Levures
	3-méthyl-2-butanone	oxydation des acides gras	<i>Staphylococcus</i>
	2-propanone	oxydation des acides gras	
	2-nonanone	oxydation des acides gras	
	4-méthyl-2-pentanone		<i>Lb. plantarum, Leuconostoc, Staphylococcus</i>
	2,3 butanedione	catabolisme des sucres	<i>Lb. plantarum, Leuconostoc, Staphylococcus</i>
	2,3 pentanedione	catabolisme des sucres	
<b>Esters</b>			
	Ethyl formiate	acide formique	<i>Lb. plantarum, Lb. casei, Streptococcus, Brevibacterium</i>
	Ethyl acétate	acide acétique	levures
<b>Furanes</b>			
	2-éthylfurane	oxydation des acides gras	
	2-pentylfurane	oxydation des acides gras	

**Tableau 40 : Origine des composés volatils discriminants les fromages**

celles en 2-méthyl-propanal, butanal, 2,3-pentanedione, 2,3-butanedione, 2-butanone, 4-méthyl-2-pentanone. Elle n'est que faiblement corrélée aux valeurs de pH et aux teneurs en acide lactique L. Les deux séries d'expérimentations sont discriminées par l'axe 2. Les variables pH et acide lactique L sont les variables qui contribuent le plus à la formation de l'axe 2 (contributions des variables basées sur les corrélations). Ainsi, les fromages de la seconde série d'expérimentations diffèrent de ceux de la première série d'essais par des teneurs en acide lactique L et des valeurs de pH plus basses. Ces variables discriminent les deux séries d'expérimentations alors que l'inhibition de *L. monocytogenes* est similaire dans les deux séries d'essais.

#### 4.4.5.3. Hypothèses sur le rôle des communautés microbiennes dans la production de métabolites

Les métabolites sont produits ou dégradés durant les 15 premiers jours d'affinage, période où les flores bactériennes, en particulier les bactéries lactiques, se développent le plus. L'intervention probable des différents groupes microbiens dans leur production est indiquée dans le tableau 40.

Ainsi, l'acide lactique D et l'acide acétique pourraient provenir du métabolisme du lactose par les souches appartenant aux *Leuconostoc* qui sont largement dominants dans les fromages dans lesquels ils ont étéensemencés. La production d'acide lactique D par racémisation de l'acide lactique L, par *Lb. plantarum* par exemple, est peu probable car les concentrations en acide lactique L et D ne sont pas inversement corrélées. L'acétate pourrait provenir du métabolisme du lactate par les bactéries lactiques non levain, les bactéries d'affinages tel que *Brevi. linens* et des levures comme *Debaryo. hansenii* (McSweeney et Sousa, 2000). Parmi les espèces de levures inoculées dans les laits, seule la souche de *Debaryo. hansenii* est capable d'assimiler le lactate.

La production d'éthyl esters (éthyl formiate, éthyl acétate, éthyl butanoate) résulte de l'estérification de l'éthanol avec différents acides (Weslh et al., 1989). La teneur en esters dépend des activités estérasiques des souches microbiennes qui peuvent selon les conditions dégrader ou produire des esters. Elle est difficile à mettre en relation avec les floresensemencées. Les levures sont reconnues pour être les principales productrices d'esters dans les fromages (Daigle et al., 1999) mais d'autres microorganismes tels que les *Lactobacillus*, les *Leuconostoc*, et les *Brevibacterium* possèdent des activités estérasiques (Liu et al., 1998). Dans les fromages étudiés, la production d'éthyl esters est associée à la présence des bactéries lactiques.

L'éthanol pourrait être produit par les *Leuconostoc* ou les levures. L'éthanol est capable d'augmenter l'inhibition de *L. monocytogenes* lorsque celle-ci est incubée à pH 3 en présence de 50 mM de formate (Baker et Park, 2001).

		4h	8h	12	18h	24h	36h	48h	192h
	linéaire								
D-lactate		0,09	-0,22	-0,29	-0,49	-0,59	-0,02	-0,46	-0,60
L-lactate		-0,33	-0,88	-1,36	-2,00	-2,21	-1,07	-2,16	-2,84
pH		0,67*	1,70**	2,12*	2,90*	3,25*	2,68	2,78	2,37
T°C		0,46*	1,24**	2,01**	3,19**	3,65**	4,53*	5,12*	3,69
	Quadratique								
D-lactate <sup>2</sup>		0,02	-0,03	-0,20	-0,26	-0,41	-0,85	-1,38	-1,23
L-lactate <sup>2</sup>		-0,08	0,03	-0,74	-1,07	-2,61	0,31	0,10	-1,09
pH <sup>2</sup>		0,76	0,60	0,50	0,11	-0,34	-1,97	-1,97	-1,52
T°C <sup>2</sup>		0,29	0,50	-0,04	-0,37	-0,32	-1,15	-2,91	-3,97
	Interactions								
D-lactate*L.lactate		0,09	-0,04	0,11	0,12	-2,30	2,01	2,18	3,73
D-lactate*pH		-0,11	0,00	-0,54	-0,68	0,11	-0,84	-0,01	-1,11
D-lactate*T°C		0,07	-0,07	0,22	-0,25	0,94	-0,33	-1,45	-0,18
L-lactate*pH		-0,30	-0,92	-0,37	-1,25	-0,69	5,04	6,20	5,67
L-lactate*T°C		-0,51	-0,27	-0,25	0,33	-0,93	-1,52	-1,46	0,31
pH*T°C		0,89	2,04*	2,94	3,52	3,53	2,08	2,41	-3,83
R <sup>2</sup>		0,92	0,96	0,92	0,94	0,94	0,81	0,83	0,68

**Tableau 41 : effet des différents facteurs sur la croissance de *L. monocytogenes* à 4h, 8h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h et 192h d'incubation.**

L'effet des différents facteurs a été calculé par régression linéaire multiple.

T°C : température en degrés Celsius.

R<sup>2</sup> : coefficient de régression

\* effet significatif à p<0,05

\*\* effet significatif à p<0,01

Les méthyl alcools et méthyl aldéhydes issus du catabolisme des acides aminés branchés ne semblent pas associés à l'inhibition de *L. monocytogenes*. De même, la 2,3 butanedione (diacétyle) décrite comme inhibitrice de *L. monocytogenes* ne semblerait pas impliquée dans l'inhibition.

Les composés d'oxydation des acides gras (aldéhydes) sont produits en quantité plus importante en absence des bactéries lactiques dans les fromages. Les bactéries lactiques limiteraient l'oxydation des acides gras en aldéhydes et orienteraient leur réduction en alcools (2-butanol, 2-pentanol, 2-heptanol).

Dans cette étude, il n'a pas été possible d'établir une relation de cause à effet entre la quantité d'alcools et d'esters produits et la moindre croissance de *L. monocytogenes*.

Afin de vérifier les relations causales entre la production de ces alcools et esters et l'inhibition de *L. monocytogenes*, des études préliminaires in vivo ont été conduites.

#### **4.5. Chapitre 5 : Effet des métabolites sur la croissance de *L. monocytogenes* in vitro**

##### **4.5.1. Objectifs**

L'objectif de cette étude était :

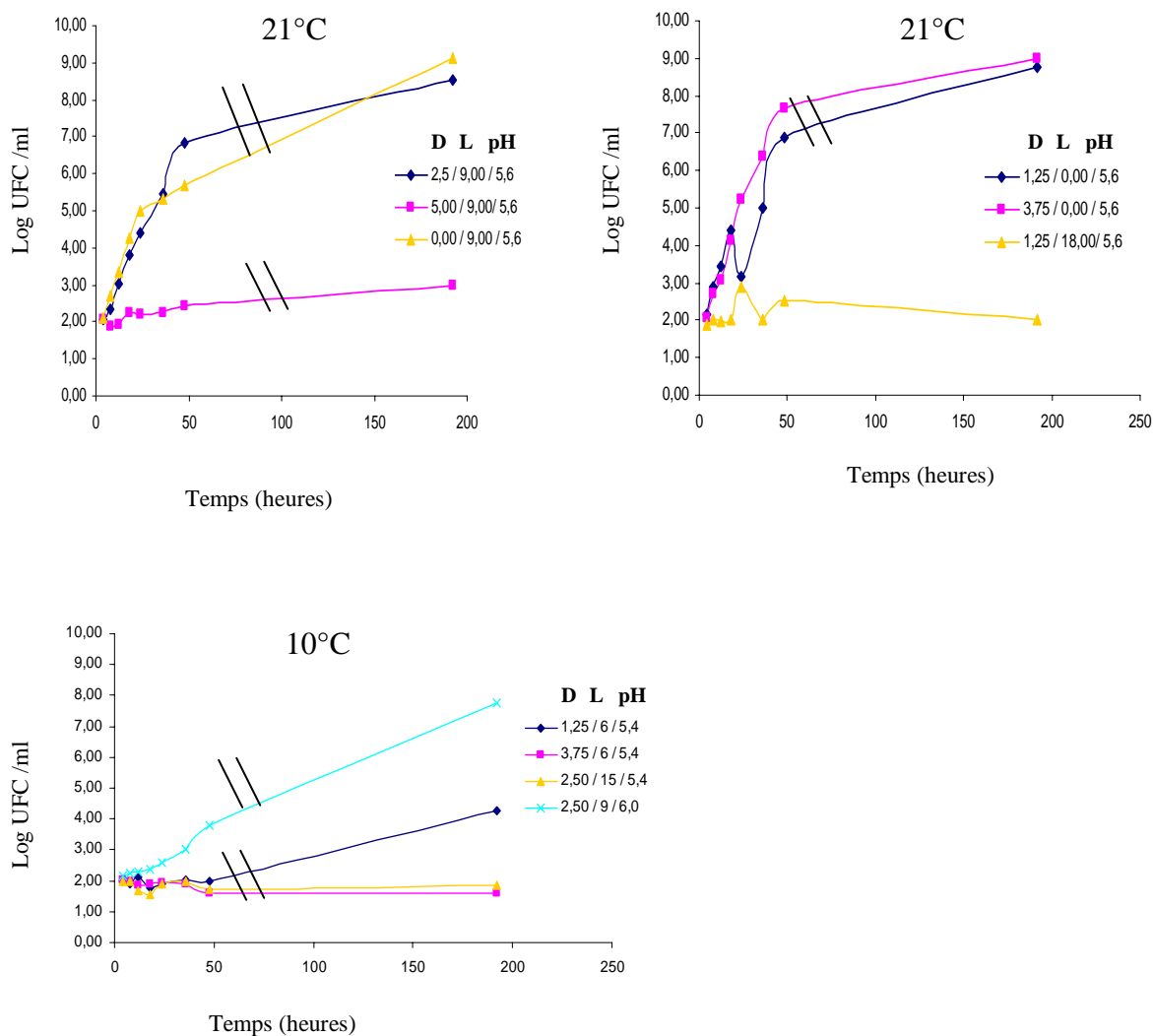
1- d'étudier les effets combinés de la température, du pH et des concentrations en acides lactiques L et D sur la croissance de *L. monocytogenes*. A cet effet, le développement de *L. monocytogenes* a été mesuré dans un milieu de culture en construisant un plan d'expériences selon la matrice de Doehlert. Les conditions de l'expérimentation ont été décrites dans la partie Matériel et Méthodes paragraphe 3.6.

2- de vérifier si certains alcools, esters et furanes, étaient inhibiteurs selon la méthodologie de Tagg et McGiven modifiée par l'utilisation d'une double gélose comme décrite au paragraphe 3.2.2.3 du Matériel et Méthodes.

##### **4.5.2. Effets du pH, de la température et des concentrations en acides lactiques L et D sur la croissance de *L. monocytogenes***

Les coefficients de régression sont les plus forts jusqu'à 24 h. Ils sont supérieurs à 0,92 (Tableau 41). Les différences de croissance de la souche de *L. monocytogenes* S1 sont donc les plus expliqués dans le modèle durant les premières 24h.

La température est le facteur influençant le plus la croissance de la souche de *L. monocytogenes* S1. L'effet du facteur température est positif, linéaire et augmente jusqu'à 48 heures ce qui suggère que plus la température d'incubation est haute (10 à 32°C), plus la croissance de la souche de *L. monocytogenes* S1 est importante.



**Figure 19 : Exemples de courbes de croissance de *L. monocytogenes* dans un milieu Tsc (données du laboratoire), incubé à 10 et 21°C, à différentes concentrations en acides lactiques L et D (mg/ml) et à différentes valeurs de pH.**

D : concentrations en acides lactiques D (mg/ml)

L : concentratins en acides lactiques L (mg/ml)

pH : valeurs de pH

De la même manière, le pH ( $5,0 < \text{pH} < 6,2$ ) influence le développement de la souche de *L. monocytogenes* S1 jusqu'à 24h. Il a un effet positif linéaire qui augmente, mettant en évidence que la croissance de *L. monocytogenes* S1 est plus forte quand les valeurs de pH sont les plus hautes.

A 8h, l'interaction des facteurs pH et température agit significativement sur le développement de *L. monocytogenes* S1.

Les teneurs en acides lactiques D et L dans les gammes de concentrations étudiées ( $0 < \text{acide lactique L} < 18 \text{ mg/g}$  ;  $0 < \text{acide lactique D} < 5 \text{ mg/g}$ ) limitent la croissance de *L. monocytogenes* même si l'effet n'est pas significatif.

A 21°C, à pH 5,6 dans un milieu contenant 9 mg/ml d'acide lactique L, *L. monocytogenes* ne se multiplie pas avec 5 mg/ml d'acide lactique D alors qu'une croissance importante est observée sans acide lactique D ou avec 2,5 mg/ml (figure 19).

Dans un milieu à pH 5,6 contenant 1,25 mg/ml d'acide lactique D, *L. monocytogenes* ne se développe pas quand le milieu contient 18mg/ml d'acide lactique L. Au contraire, elle se multiplie à pH 5,6 dans un milieu sans acide lactique L mais avec des teneurs en acide lactique D de 1,25 ou de 3,75 mg/ml (figure 19).

A 10°C, la phase de latence de *L. monocytogenes* est supérieure à 50 h (dans toutes les conditions testées à pH 5,4) sauf dans le milieu à pH 6 contenant de 2,5 mg/ml d'acide lactique D et 9 mg/ml d'acide lactique L où elle est plus courte. Après 50 h d'incubation, *L. monocytogenes* est capable de se multiplier dans un milieu à pH 5,4 contenant 6mg/ml d'acide lactique L et 1,25 mg/ml d'acide lactique D alors qu'elle ne se développe dans le milieu contenant 3,75 mg/ml d'acide lactique D (figure 19).

#### **4.5.3. Activité antilisteria en milieu gélosé de certains alcools, esters et furanes**

Le potentiel antilisteria de différentes concentrations d'alcools, d'esters et de furanes ont été testées en milieu gélosé selon la méthode de Tagg et McGiven (1971). Il n'a pas été testé en milieu liquide car les solutions d'ester n'y étaient pas miscibles. Les puits creusés dans la gélose ont été remplis par des dilutions décimales des différents composés à tester. Après 24 h d'incubation à 37°C, parmi tous les alcools testés, seul le 2-propanol n'a pas inhibé *L. monocytogenes*. Le plus grand diamètre d'inhibition de *L. monocytogenes*, 8 mm a été mesurée en présence de 2-pentanol. Cependant, *L. monocytogenes* n'était inhibée que lorsque le 2-pentanol, le 2-butanol le 2-méthyl-1-propanol, le 3-méthyl-1-butanol, le 2-méthyl-1-butanol, le 2 éthyl furane et l'éthyl caproate ont été testés purs (100%). Lorsqu'ils ont été dilués au  $10^{\text{ème}}$ , aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

Au contraire, *L. monocytogenes* était sensible au 1-pentanol (zone d'inhibition de 6 mm) et à l'éthyl acétate (zone d'inhibition de 4 mm) dilués au  $10000^{\text{ème}}$  (0,01%).

#### **4.5.4. Conclusions**



Cette étude montre que, dans nos conditions d'expérimentation, certains alcools et esters sont capables d'inhiber *L. monocytogenes*.

Cette étude conforte également l'hypothèse d'un rôle synergique du pH, de la température et des concentrations d'acides lactiques D et L pour contrôler le développement de *L. monocytogenes* en fromages.

Des conditions inhibitrices in vitro peuvent être rencontrées dans les fromages. Ainsi, en cours de fabrication, la température peut être de 21°C, le pH de 5,6, les teneurs en acide lactique L variables de 5 à 18 mg/g et celles en acide lactique D de 0 à 1 mg/g.

De même, lors de l'affinage des fromages étudiés dans le chapitre 2, la température était de 10°C, le pH de 5,4 et les teneurs en acide lactique L variaient de 3 à 10 mg/g et en acide lactique D de 0 à plus de 3 mg/g.

Ces conditions inhibitrices in vitro le sont également in vivo puisqu'une inhibition de *L. monocytogenes* avait été observée.

Si la température agit directement sur la croissance de *L. monocytogenes*, les valeurs de pH, quant à elles, peuvent influencer sur son développement soit directement ou indirectement en conditionnant les proportions des formes dissociées et non dissociées des acides. L'activité inhibitrice des acides sur *L. monocytogenes* n'est pas liée uniquement à l'abaissement du pH intracellulaire mais aussi à l'action de l'acide, sous forme non dissociée, sur le métabolisme cellulaire. La forme non dissociée de l'acide pénètre dans la cellule, se dissocie dans le cytoplasme entraînant l'abaissement du pH intracellulaire (Ariyapitipun et al., 2000). Le pKa de l'acide lactique étant de 3,86, la forme dissociée des acides prédomine dans les milieux aux valeurs de pH étudiées (pH>5,0).





# **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**



## 5. Conclusions générales et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse répondent partiellement aux objectifs fixés sur l'effet de barrière des flores microbiennes vis-à-vis de *L. monocytogenes* dans un fromage.

Nos résultats apportent des éléments de réponse sur la biodiversité qualitative et quantitative pour faire barrière à *L. monocytogenes* puis ils contribuent à mieux identifier comment. En effet, les populations microbiennes de certains laits crus sont capables d'inhiber *L. monocytogenes*. La stabilité de l'inhibition observée avec les laits de l'exploitation F5 semblerait indiquer que les populations inhibitrices étaient présentes dans les laits durant toute la période d'étude (essais réalisés pendant 2 ans). Elles ont pu être identifiées par une double approche :

- en comparant les profils microbiens de fromages inhibiteurs ou non par la technique de SSCP et en vérifiant que les souches caractérisant les fromages sans croissance de *L. monocytogenes* sont effectivement inhibitrices en fromages.

- en identifiant les populations microbiennes de la communauté microbienne du lait cru F5 inhibitrice de *L. monocytogenes* et en testant leur capacité antilisteria en fromages via des associations microbiennes plus ou moins complexes.

Nos résultats permettent de conclure que le groupe des bactéries lactiques a un rôle prépondérant et il existe, dans l'écosystème, une redondance des fonctions inhibitrices entre les populations. Plusieurs espèces de bactéries lactiques peuvent être impliquées dans l'inhibition. Ainsi, des souches appartenant aux espèces *Lc. lactis* et *Lc. garvieae* sont capables d'inhiber la croissance de *L. monocytogenes*. Ces espèces sont fréquemment isolées de lait cru (Quadghiri et al., 2005) et l'utilisation de *Lc. lactis* comme ferment est largement répandue.

En absence de ces deux espèces, les espèces appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus* pourraient prendre le relais mais le test d'omission n'a pas été suffisamment poursuivi pour identifier quelles étaient les espèces réellement impliquées. *E. saccharominimus* limite le développement de *L. monocytogenes* en fin d'affinage. *E. faecium* présent dans le groupe des bactéries lactiques, dans l'expérimentation du chapitre 4, n'inhibe pas *L. monocytogenes* en fromage quand il est inoculé en lait pasteurisé. Il serait nécessaire de procéder soit à des omissions successives dans le groupe des bactéries lactiques soit de tester individuellement ou en associations les différentes espèces.

Le groupe des bactéries à Gram positif non lactiques pourrait jouer un rôle dans l'inhibition. Ainsi, la souche de *Coryne. flavescentis* est capable de limiter le développement de *L. monocytogenes* dans des fromages au lait pasteurisé quand son niveau cellulaire atteint 6 log UFC/g (cf. chapitre 3). Elle était présente dans la communauté microbienne du groupe B des bactéries à Gram positif non lactiques qui agit en synergie avec les bactéries lactiques dans l'inhibition de *L. monocytogenes*, dans l'étude du



chapitre 4. Ce groupe contenait aussi d'autres espèces qui pourraient intervenir dans l'inhibition. Ainsi, par exemple, *Staph. equorum* était présent et des souches de cette espèce ont été décrites productrices d'un antibiotique aux activités antilisteria, la micrococcine (Carnio et al., 2000). Par contre, le groupe des bactéries à Gram positif non lactiques n'a pas d'action inhibitrice s'il est associé aux levures ou aux bactéries à Gram négatif.

Le groupe des levures pourrait intervenir dans l'inhibition de *L. monocytogenes* lorsqu'elles sont associées aux bactéries lactiques et aux bactéries à Gram positif non lactiques. Elles joueraient cependant un moindre rôle. Les souches de levures appartenant aux espèces *Debaryo. hansenii*, *C. pararugosa*, *C. pseudointermedia*, *C. deformans* et *Rhodo. babjevae* ont un développement limité dans les fromages puisque leur niveau est globalement inférieur à 5 log UCF/g. Excepté *Debaryo. hansenii* fréquemment isolées dans les laits et les fromages (Besançon et al., 1992 ; Callon et al., 2005), les autres espèces étudiées dans le chapitre 4 ont été rarement décrites dans les fromages.

Le groupe des bactéries à Gram négatif que nous avons étudié ne semblerait pas être capable d'influer la croissance de *L. monocytogenes* ni en terme d'inhibition ni en terme d'activation. *Chryseo. sp.* que nous avons plus particulièrement étudié dans le chapitre 3 n'inhibe pas *L. monocytogenes*. La relation de commensalisme entre des *Pseudomonas spp.* et *L. monocytogenes* notée par Marshall et Schmidt (1991) en milieu lait n'a pas été observée en fromage dans nos conditions de fabrication.

L'ensemble de ces résultats nous amène à nous interroger sur l'importance de la densité cellulaire dans l'inhibition. Le groupe des bactéries lactiques, en particulier les souches des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* producteurs de dextrane présentent, en effet, la plus forte densité cellulaire et ont modifié la composition biochimique du produit comme il sera précisé ci-dessous. Une augmentation des niveaux de levures, des bactéries à Gram positif non lactiques pourrait-elle conduire à une inhibition plus marquée par encombrement spatial ou production de métabolites?

Nos résultats contribuent à mieux identifier comment les populations microbiennes de bactéries lactiques interviennent dans l'inhibition.

Dans cette étude, les souches étudiées ne semblent pas capables de produire des bactériocines dans nos conditions d'expérimentations, selon la méthode Tagg et McGiven (1971). Ces composés ne seraient donc pas impliqués dans l'inhibition. Or, selon les données de la littérature, certaines souches d'*Enterococcus spp.* sont capables de produire en fromages des entérocinés inhibitrices de *L. monocytogenes* (Nunez et al., 1999 ; Garcia et al., 2004). La pédiocine produite par certaines souches de *Lb. plantarum* aurait un potentiel antilisteria dans un fromage à pâte molle (Ennahar et al., 1998). *Lc. lactis* est, quant à elle, capable d'inhiber *L. monocytogenes* par production de bactériocines telles que la nisine, la lacticine, la piscicoline, et la pédiocine (Wan et al., 1997 ; Olasupo et al., 1998; Rodriguez et al., 2005 ; O Sullivan et al., 2005). La linenscine produite par *Brevi. linens* possède également un potentiel antilisteria en fromage (Maisnier Patin et al., 1996).



Certaines souches de *Lc. garvieae* ont révélé, en milieu de culture, un potentiel anti-listeria (Ammor et al., 2005). *Lc. garvieae* serait capable d'inhiber *Staphylococcus aureus* par production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Alomar et al., 2007). Il reste à vérifier si *L. monocytogenes* est sensible à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et si cette molécule est produite par *Lc. garvieae* en fromages.

Les populations de bactéries lactiques contribuent à l'inhibition de la souche de *L. monocytogenes* S1 par diminution des valeurs de pH. En conditions de laboratoire, dans la gamme de pH comprise entre 5 et 6,2, la croissance de *L. monocytogenes* est la plus forte quand les valeurs de pH sont les plus hautes. En fromage, le développement de *L. monocytogenes* est favorisé par des valeurs de pH supérieures à 5,3. Les bactéries lactiques et plus particulièrement *Lc. lactis* en abaissant le pH en dessous de cette valeur, seraient capables d'inhiber *L. monocytogenes*, corroborant les études de Pitt et al. (2000).

Cependant, dans les fromages tels que préparés dans cette thèse, même à des pH voisins de 5,2, *L. monocytogenes* se multiplie dans certains fromages. L'inhibition observée par inoculation de certaines combinaisons microbiennes avait donc une autre origine. Les acides organiques produits par les bactéries lactiques contribuent à l'inhibition. En conditions de laboratoire, les acides lactiques L et D participeraient avec le pH et la température à l'inhibition de *L. monocytogenes*. En fromage au lait cru, l'inhibition de *L. monocytogenes* a pu être associée en début d'affinage à des teneurs en acide lactique L supérieures à 14 mg/g (chapitre 1). Cet effet inhibiteur a été confirmé dans des fromages au lait pasteurisé après inoculation de *Lc. lactis* et de *Lc. garvieae* et début d'affinage. En cours d'affinage, les acides lactique D et acétique ont un effet inhibiteur. Ils pourraient être produits par *Ln. citreum*, *Ln. mesenteroides* et par *Lb. casei*, espèces dominantes dans les fromages étudiés. Ces travaux corroborent ceux de Wenzel et Marth, 1990 ainsi que ceux de Hicks et Lund, 1991 qui ont montré que *Lc. lactis* est capable d'inhiber *L. monocytogenes* par production d'acides organiques. Ils confirment la plus forte sensibilité de *L. monocytogenes* à l'isomère de l'acide lactique D plutôt qu'à celui de l'acide lactique L notée par Gravesen et al. (2004).

Selon les données de la littérature, dans une gamme de pH variant de 5,4 à 5,8, l'acide acétique testée à des concentrations comprises entre 60 et 76,67 mmol/l serait plus efficace que des concentrations en acide lactique variant de 71 à 84,44 mmol/l pour inhiber *L. monocytogenes* (Vasseur et al. 1999). Ce classement pourrait s'expliquer par le fait que le pKa de l'acide acétique est supérieur à celui de l'acide lactique. Pour un même pH, la quantité d'acide acétique sous forme non dissociée est plus importante que celle de l'acide lactique sous cette même forme. Or, les acides organiques à l'état non dissocié traversent facilement la membrane plasmique pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Ils seraient donc plus efficaces que les acides organiques sous forme dissociée. L'importance des teneurs en acide lactique dans l'inhibition de *L. monocytogenes* pourrait expliquer la difficulté de son contrôle à la surface des fromages. En effet, en présence d'un développement important de levures, le lactate peut-être dégradé. Dans la pâte des fromages étudiés, nous n'avons pas noté de forte diminution de l'acide lactique.





Les relations causales entre la production d'alcools, d'esters et l'inhibition de *L. monocytogenes* sont plus difficiles à établir. Il semble à peu près certain que ces métabolites soient liés à la présence des bactéries lactiques avec, en particulier, une participation des *Leuconostoc* dans la production d'éthyl esters via la production d'éthanol. Par contre, il est prématuré de conclure sur le rôle des esters et des alcools dans l'inhibition. Nous avons pu mettre en évidence des concentrations minimales inhibitrices de *L. monocytogenes* par des tests de diffusion en gélose. Cependant, il est difficile d'extrapoler ces résultats dans un fromage en l'absence de données sur la volatilité et la diffusion de ces molécules dans les gélases. Les concentrations en alcool (éthanol) des fromages peuvent être d'environ 60 mg/g et celles des esters varient entre 1 et 128 ng/g (Thierry et al., 2006). Une quantification de ces métabolites devra être envisagée dans de futures expérimentations. Ceux-ci participent à la flaveur des fromages (Daigle et al., 1999) et nos résultats montrent une diversité d'équilibre de ces molécules volatiles selon les inoculations microbiennes des laits. Ils arguent en faveur du rôle de la biodiversité microbienne pour la genèse de la diversité sensorielle.

Cette étude a mis en évidence les difficultés pour attribuer la production de métabolites à la présence d'une espèce microbienne. Une nouvelle étape de simplification des communautés microbiennes permettrait de mieux appréhender les interactions microbiennes, de confirmer quelles sont les espèces microbiennes qui interviennent dans l'inhibition et d'analyser plus finement la production de métabolites par les microorganismes.

Par ailleurs, nos travaux ont mis en exergue les difficultés d'étude des interactions dans une communauté microbienne initialement composée de 32 espèces. Ces difficultés sont inhérentes à l'absence de méthodes rapides et fiables pour suivre et quantifier ces différentes espèces étudiées. En effet, dans la présente étude, il n'a été possible de suivre quantitativement que la dynamique des quelques genres microbiens appartenant au groupe des bactéries lactiques. A cet égard, le dénombrement sur milieux sélectifs s'avère pertinent pour les genres *Leuconostoc* (souches productrices de dextranes), *Enterococcus* et *Lactobacillus* mésophiles. La culture sur milieu OGA renseigne sur l'évolution des populations de levures quand les espèces étudiées sont différenciables par leur morphologie. Les équilibres entre les différentes espèces de levures sembleraient dépendants des autres espèces présentes. En effet, il semblerait que le niveau de levures soit plus faible en présence de bactéries lactiques. Par contre, cette approche culture dépendante, en raison du manque de sélectivité des milieux n'est pas performante pour quantifier les genres du groupe des bactéries à Gram positif non lactiques et ceux du groupe des bactéries à Gram négatif.

L'approche non culture dépendante, par application de la technique SSCP, présente un intérêt pour évaluer au cours du temps les changements des équilibres entre les populations. Elle s'est aussi révélée pertinente pour émettre des hypothèses sur les populations impliquées dans l'inhibition. Elle manque cependant d'acuité pour évaluer la composition de cette communauté et apporte moins d'information qu'une méthode culture dépendante tant que ne seront pas résolus les problèmes



d'extraction, d'amplification préférentielle et de coélutions d'acides nucléiques d'espèces différentes. L'image de la composition microbienne varie selon les méthodes mises en œuvre pour la mesurer. Cette divergence est clairement apparue dans cette étude en particulier pour les populations de levures. Une meilleure compréhension des interactions pourrait reposer sur une modélisation de la croissance des populations microbiennes à condition de s'assurer de la fiabilité de la quantification et de disposer de méthodes permettant de générer une mesure des données importantes à des points de cinétiques rapprochés. Ceci impliquera de développer des méthodes rapides de quantification. Dans un écosystème aux communautés microbiennes reconstituées, la mise au point d'amorces spécifiques pour les différentes espèces peut-être envisagée pour une quantification par PCR quantitative. Une quantification des isolats sur milieux de culture après leur identification pourrait s'avérer intéressante. Une identification rapide des isolats pourrait être envisagée par des techniques via des PCR d'espèces ou par RFLP.

L'utilisation de l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) permettrait d'étudier la répartition spatiale des différentes populations microbiennes. Combinée à la micro-autoradiographie, elle pourrait donner des informations sur l'utilisation des substrats.

Cette étude montre que les flores microbiennes des laits crus sont un atout pour faire barrière aux pathogènes et pourraient être des garants de la sécurité sanitaire des fromages. Il serait souhaitable de favoriser l'implantation des flores lactiques dès la production de lait car il est important que celles-ci atteignent des niveaux élevés en cours de process. Avant d'envisager de telles stratégies, il faudra préciser les espèces impliquées et si les phénomènes sont souches dépendantes. Il conviendrait aussi de préciser quel niveau minimum de population est nécessaire dans les laits.

L'étude ouvre des perspectives de recherche dans plusieurs directions. Il serait intéressant d'approfondir la réponse aux acides de *L. monocytogenes* et d'évaluer la possible apparition de souches résistantes. Des recherches devraient être entreprises pour mieux décrire et comprendre les interactions au sein des fromages, ce qui passera par la mise au point de méthodes de quantification.



# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

---

- AFNOR,. 1985. Directives générales pour le dénombrement sans revivification des *Enterobacteriaceae*. Technique NPP et méthode par comptage des colonies. Standard NF V 08-021. Association Française de Normalisation (AFNOR).
- AFNOR,. 1988. Viandes et produits à base de viande. Dénombrement des *Pseudomonas*. Standard NF V 04-054. Association Française de Normalisation (AFNOR).
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (In Press, Corrected Proof) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1--Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*.
- Ariyapitipun, T., A. Mustapha, and A. D. Clarke. 2000. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin In Process Citation. *Journal of Food Protection* 63, no. 1: 131-136.
- Arques, J. L. , E. Rodriguez, P. Gaya, M. Medina, and M. Nunez. 2006. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal* .
- Augustin, J. C., and V. Carlier. 2000. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology* 56: 53-70.
- Avi Eldar., G. Mariella, G. Claudio, Z. Amir, and B. Herve. 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 65, no. 3: 1005-1008.

### B

---

- Bachmann, H. P., and U. Spahr. 1995. The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 78, no. 3: 476-483.
- Bayles, D. O. , B. A. Annous, and B. J. Wilkinson. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 62, no. 3: 1116-1119.
- Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, no. 1: 1-20.
- Benkerroum, N., and WE. Sandine. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science* 71, no. 12: 3237-3245.
- Beresford, T., and A. Williams. 2004. The microbiology of cheese ripening. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed., P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, 287-317. Vol. 1 - General aspects.
- Bertolini, Massimo, Antonio Rizzi, and Maurizio Bevilacqua. 2007. An alternative approach to HACCP system implementation. *Journal of Food Engineering* 79, no. 4: 1322-1328.





- Besançon, X., C. Smet, C. Chaballier, M. Rivemale, J. P. Reverbel, R. Ratomahenina, and P. Galzy. 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology* 17, no. 1: 9-18.
- Beuvier, E. 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. [www.centre.fromager.com](http://www.centre.fromager.com)
- Bolton, L. F., and J. F. Frank. 1999. Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection* 62, no. 6: 601-609.
- Boudry C., Korsak N., Jacob B., Etienne G., Thewis A., and Daube G. 2002. Ecologie de *Salmonella* dans le tube digestif du porc à l'abattage et étude de la contamination des carcasses. *Ann. Méd. Vét.* 146: 353-360.
- Boussouel, N. , F. Mathieu, A.-M. Revol-Junelles, and J.-B. Milliere. 2000. Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 61, no. 2-3: 169-175.
- Breidt, F. and Fleming, H. P., 1998. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3159-3165.
- Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, P. J. Simpson, P. F. Fox, and T. M. Cogan. 2001. *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 51, no. Pt 3: 843-852.
- Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, M. Vancanneyt, T. M. Cogan, and P. F. Fox. 2001. *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear- ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, no. 6: 1969-1976.
- Brennan, N. M., A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow, and T. M. Cogan. 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68, no. 2: 820-830.
- Brouillaud-Delattre, A., Maire, M., Collette, C., Mattei, C., and Lahellec, C., 1997. Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International* 80, 913-919.
- Buazzi, M. M. , M. E. Johnson, and E. H. Marth. 1992. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Swiss cheese. *Journal of Dairy Science* 75: 380-386.
- Buazzi, M. M. , M. E. Johnson, and E. H. Marth. 1992. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss cheese. *Journal of Dairy Science* 75, no. 2: 380-386.
- Buyong, N., J. Kok, and J. B. Luchansky. 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *L. actococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, To control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 64, no. 12: 4842-4845.

## C

- Callon, C., L. Millet, and M. C. Montel. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research* 71, no. 2: 231-244.



- Callon, C., J. L. Berdagué, E. Dufour, and M. C. Montel . 2005. The Effect of Raw Milk Microbial Flora on the Sensory Characteristics of Salers-Type Cheeses. *Journal of Dairy Science* 88, no. 11: 3840-3850.
- Callon, C., C. Delbès, F. Duthoit, and M. C. Montel. 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 29, no. 2: 172-180.
- Carnio, M. C., A. Holtzel, M. Rudolf, T. Henle, G. Jung, and S. Scherer. 2000. The Macrocyclic Peptide Antibiotic Micrococcin P1 Is Secreted by the Food-Borne Bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and Inhibits *Listeria monocytogenes* on Soft Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 66, no. 6: 2378-2384.
- Carminati, D., Perrone, A., Neviani, E. and Mucchetti, G., 2000. Influence of traditional brine washing of smear Taleggio cheese on the surface spreading of *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection* 63, 1353-1358.
- Cerf, O., Sanna, M., Dufour, B. and B., Toma. 1996. Nomenclature proposée pour l'analyse des risques en santé humaine et animale. *Epidémiol. et santé anim.* 3°, 35-43
- Choisy, C., M. Desmazeaud, M. Gueguen, J. Lenoir, J. L. Schmidt, and C. Tourneur. 1997. Les phénomènes microbiens. *Le fromage*. A. Eck, and J. C. Gillis, 377-446. Paris: Technique et Documentation, Lavoisier.
- Choisy, C., M. J. Desmazeaud, J. C. Gripon, G. Lamberet, and J. Lenoir. 1997. La biochimie de l'affinage. Chapitre 4. *Le Fromage*. 3<sup>ème</sup> ed. A. Eck , and J. C. Gillis, 86-161. Paris: Technique et Documentation, Lavoisier.
- Choisy, C., M. J. Desmazeaud, M. Gueguen, J. Lenoir, J. L. Schmidt, and C. Tourneur. 1997. Les phénomènes microbiens. Chapitre 10. *Le Fromage*. 3<sup>ème</sup> ed. A. Eck , and J. C. Gillis, 377-446. Paris: Technique et Documentation, Lavoisier.
- Cimons, M., 2001. Food safety concerns drive FDA review of fine cheeses. *ASM News* 67, 1-6.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. and Comi, G., 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* 90, 83-91.
- Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-salvadori, P. S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M. C. Rea, and E. Rodriguez. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64: 409-421.
- Conner, D. E., V. N. Scott, and D. T. Bernard. 1990. Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food Protection* 53: 652-655.
- Coote, JP., C. D. Holyoak, and M. B. Cole. 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during a process simulating temperatures achieved during microwave heating. *Journal of Applied Bacteriology* 70, no. 6: 489-494.

## D

- Daigle, P., Gelinas, P., Leblanc, D. and Morin A. 1999. Production of aroma compounds by *Geotrichum*



*candidum* on waste bread crumb. *Food Microbiology* 16, 517-522

- Dale, G. 1972. Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire. *Revue Laitière Française* : 199-203.
- Davies, E. A. , H. E. Bevis, and J. Delves-Broughton. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 24, no. 5: 343-346.
- De Buyser, M. L., B. Dufour, M. Maire, and V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 67, no. 1-2: 1-17.
- De Buyser, M. L., B. Lombard, S. M. Schulten, P. H. In't Veld, S. L. Scotter, P. Rollier, and C. Lahellec. 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999--Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *International Journal of Food Microbiology* 83, no. 2: 185-194.
- Delbes, C., L. Ali Mandjee, and M. C. Montel. 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 73, no. 6.
- Denis C., M. Gueguen, E. Henry, and D. Levert. 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81: 365-379.
- Devaux M. and M. Hébraud. 2006. The protein secretion system in *Listeria* : inside out bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev* 30, n°5 : 774-805.
- DGAL report 2004 : report for Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) of a project on « les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber *Listeria monocytogenes* dans les filières fromagères traditionnelles ? : cas du fromage Saint-Nectaire ».
- Dieuleveux, V., D. Van Der Pyl, J. Chataud, and M. Gueguen. 1998. Purification and Characterization of Anti-*Listeria* Compounds Produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, no. 2: 800-803.
- Doehlert, D. H. 1970. Uniform Shells Designs. *Applied Statistics* 19, no. 3: 231-239.
- Donnelly, C. W. 2001. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw milk : a review. *Bulletin of the International Dairy Fédération* 369: 16-27.
- Duthoit, F., C. Callon, L. Millet, J. J. Godon, and M. C. Montel. 2000. Inventaire par SSCP des flores microbiennes d'un caillé de fromage d'AOC Salers. *3<sup>ème</sup> Colloque National du Bureau des Ressources Génétiques "Connaissance et gestion des ressources génétiques"*.
- Duthoit, F., C. Delbès, C. Callon, and M. C. Montel. 2003. Dynamique des populations dans les communautés microbiennes des fromages au lait cru: cas de l'AOC Salers. *Colloque d'Ecologie Microbienne* .
- Duthoit, F., J. J. Godon, and M. C. Montel. 2003. Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene Single Strand Conformation Polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 7: 3840-3848.



## E

---

- El-Baradei, G., A. D. Buchet, P. Pery, and J. C. Ogier. 2005. Occurrence of *Lactococcus garvieae* in four types of Egyptian cheeses by specific polymerase chain reaction assay. *Journal of Dairy Science* 33, no. 1: 35-41.
- Eliskases-Lechner, F., and W. Ginzinger. 1995. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait* 75: 271-584.
- El-Shenawy, M. A., and E. H. Marth. 1990. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of gluconic acid and during preparation of cottage cheese curd using gluconic acid. *Journal of Dairy Science* 73, no. 6: 1429-1438.
- El-Shenawy, M. A., A. E. Yousef, and E. H. Marth. 1989. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in broth or in ground beef. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie* 22: 387-390.
- Elsner, H. A., I. sobottka, D. Mack, R. Laufs, M. Claussen, and R. Wirth. 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 19, no. 1: 39-42.
- Engels, W. J. M., and S. Visser. 1996. Development of cheese flavour from peptides and amino acids by cell-free extracts of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 in a model system. *Netherlands Milk Dairy Journal* 50, no. 1: 3-17.
- Ennahar, S., O. Assobhel, and C. Hasselmann. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection* 61, no. 2: 186-191.
- Ennahar, S., and N. Deschamps. 2000. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 88, no. 3: 449-457.
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M., and Scherer, S., 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4812-4817.
- Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G. and Coppola, S., 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* 96, 263-270.

## F

---

- Farag, Shamsuzzaman M. D. H. K., and J. Borsa. 1990. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in phosphate buffer, trypticase soy broth and poultry feed. *Journal of Food Protection* 53: 648-651.
- Farias, M. E., R. N. Farias, A. P. de Ruiz Holdago, and F. Sesma. 1996. Purification and N-terminal amino-acid sequence of Enterocin CRL35, a "pediocin-like" bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Letters in Applied Microbiology* 22, no. 6: 417-419.
- Farias, M. E. , Nunez de Kairuz M., Sesma F., Palacios J. De Ruiz Holgado A. P., and Olivier G. 1999.





Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin CRL35 during goat cheese making . *Milchwissenschaft* 54, no. 1: 30-32

Fefer, J. J. , K. R. Ratzan, S. E. Sharp, and E. Saiz. 1998. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 32, no. 2: 127-130.

Fleet, G. H. 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68, no. 3: 199-211

Foulquie Moreno, M. R., M. C. Rea, T. M. Cogan, and L. De Vuyst. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co- culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 81, no. 1: 73-84.

Fresse P. 1993. *Listeria monocytogenes* dans les laits et les produits laitiers. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Toulouse. 68 pages

## G

---

Gahan, C. G., O'Driscoll, B., and Hill, C., 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3128-3132.

Gallot-Lavallée, T. 1998. Efficacité du traitement par les hautes pressions sur la destruction de *Listeria monocytogenes* dans des fromages de chèvre au lait cru. *Science Des Aliments* 18, no. 6: 647-655.

Gandhi, M. and L. M. Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Sous presse. *International Journal of Food Microbiology* 113, no.1:1-15

Garcia, M. T., Martinez Canamero, M., Lucas, R., Ben Omar, N., Perez Pulido, R. and Galvez, A., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *International Journal of Food Microbiology* 90, 161-170.

Gay, M., and A. Amgar. 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and soft cheese made from raw milk . *Lait* 85: 153-170.

Gelsomino, R., M. Vancanneyt, S. Condon, J. Swings, and T. M. Cogan. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology* 71, no. 2-3: 177-188.

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-222.

Giraffa, G., and D. Carminati. 1997. Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface-smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7C5. *Sciences Des Aliments* 17: 383-391.

Giraffa, G., D. Carminati, and E. Neviani. 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection* 60, no. 6: 732-738.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A. and F., Baquero. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, no. 5543: 849-852

Glass, K. A. , B. B. Prasad, J. H. Schlyter, H. E. Uljas, N. Y. Farkye, and J. B. Luchansky. 1995. Effects of



acid and altatm 2341 on *Listeria monocytogenes* in a queso blanco type of cheese. *Journal of Food Protection* 58, no. 7: 737-741.

Godon, J. J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63, no. 7: 2802-2813.

Gomri, G. 1946. Buffers in the range of pH 6.5 to 9.6. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine* 6, 233-234.

Grappin, R., and E. Beuvier. 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal* 7, no. 12: 751-761.

Gravesen, A., A. M. Jydegaard Axelsen, J. Mendes da Silva, T. B. Hansens, and S. Knochel. 2002. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 756-764.

Greenway, D. L. A., and G. H. Dyke. 1979. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 115: 233-245.

Gueguen, M., and J. L. Schmidt. 1992. Les levures et *Geotrichum candidum*. *Les Groupes Microbiens D'Intérêt Laitier*: 165-219.

Guorira, O. Z., and E. M. Buys. 2005. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology* 22, no. 2-3: 159-168.

---

## H

Hamon M., Bierne H. and P. Cossart. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol* 4, no. 6: 423-434

Hechard, Y., and H. G. Sahl. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84, no. 5-6: 545-557.

Hicks, S. J. , and B. M. Lund. 1991. The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 70, no. 4: 308-314.

Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., and Gahan, C. G. M., 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes* : jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal* 12, 273-283.

Hoppe-Seyler, T. S., B. Jaeger, W. Bockelmann, W. H. Noordman, A. Geis, and K. J. Heller. 2004. Molecular Identification and Differentiation of *Staphylococcus* Species and Strains of Cheese Origin. *Systematic and Applied Microbiology* 27, no. 2: 211-218.

Huhtanen, C. N. R. K. Jenkins, and D. W. Thayer. 1989. Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52: 610-613.

Husu, J. R., J. T. Seppanen, S. K. Sivela, and A. L. Rauramaa. 1990. Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *Zentralbl Veterinarmed B* 37, no. 4: 268-275.

---

## I



- IDF. 1991. Milk and milk products. Microorganisms. Colony count at 30°C. FIL-IDF Standard 100B. *International Dairy Federation*.
- IDF. 1990. Milk and milk products. Yeasts and Moulds. FIL-IDF Standard 94B. *International Dairy Federation*.
- Irlinger, F., A. Morvan, N. El Solh, and J-L. Bergère. 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative Staphylococci in ripening flora from traditional french cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 319-328.
- Irlinger, F., A. Movan, N. El Sohl, and J. L. Bergere. 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 319-328.
- Irlinger, F. 2000. "Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages." Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Irlinger, F. 2005. La flore de surface des fromages a croûte lavée. *Les fermentations au service des produits de terroir*. INRA Editions ed., M. C. Montel, C. Béranger, and J. Bonnemaire, 215-226. Paris.
- Irlinger, F., F. Bimet, J. Delettre, M. Lefevre, and P. A. D. Grimont. 2005. Arthrobacter Bergerei Sp Nov and Arthrobacter Arilaitensis Sp Nov., Novel Coryneform Species Isolated From the Surfaces of Cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 457-462.
- Isolini, D., Grand, M. and Glättli, H., 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweiz. Milchw. Forschung*. 19, 57-59.

## J

---

- Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J. and E., Tcheneva, 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *Journal of Clinical microbiology* 37, no: 1: 103-109.

## K

---

- Kayal, S. and A. Charbit. 2006. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol. Rev* 30, n°4: 514-529.
- Kinderlerer, J. L., H. E. Matthias, and P. Finner. 1996. Effect of medium-chain fatty acids in mould ripened cheese on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Research* 63, no. 4: 593-606.
- klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, no. 3: 337-349.
- Ko, R., L. T. Smith, and G. M. Smith. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 176, no. 2: 426-431.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C. R. Banner, and J. L. Fryer. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, no. 3: 406-409.



## L

---

- Larpent, J. P. 2000. *Listeria. Tec Et Doc*: 1-165.
- Larpin-Laborde, S. 2006. "*Geotrichum candidum* et autres levures de surface du Livarot : inventaire, dynamique et potentialités allélopathyiques." Université de Caen/Basse Normandie - UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée - Ecole doctorale Chimie-Biologie Normandie.
- Laukova, A., and S. Czikkova. 2001. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. *Folia Microbiol (Praha)* 46, no. 2: 157-160.
- Lawrence, L. M., and A. Gilmour. 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 61, no. 6: 2139-2144.
- Leclercq-Perlat, M. N., A. Oumer, J. L. Bergere, Spinnler H.E., and G. Corrieu. 1999. Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research* 66: 271-281.
- Le Fromage, Eck, A and G. Gillis. 3<sup>ème</sup> édition
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, no. 1-3: 181-186.
- Lemaire, V., O. Cerf, and A. Audrier. 1989. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Immunol Hungarica* 36, no. 2-3: 281-284.
- Le Marc, Y., V. Huchet, C. M. Bourgeois, J. P. Guyonnet, P. Mafart, and D. Thuault. 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, no. 2-3: 219-237.
- Lindquist, S. 1986. The head Shock Response. *Annual Review of Biochemistry* 55: 1151-1191.
- Linton, R. H., J. B. Webster, M. D. Pierson, J. R. Bishop, and C. R. Hackney. 1992. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 55, no. 2: 84-87.
- Liu, D., A. J. Ainsworth, F. W. Austin, and M. L. Lawrence . 2004. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 91, no. 3: 297-304.
- Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. II Morse, and B. J. Wilkinson. 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Expressed in Response to Growth at Low Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 68, no. 4: 1697-1705.
- Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S. and Scherer, S., 2003. A Pediocin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strain Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Multispecies Cheese Surface Microbial Ripening Consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1854-1857.
- Lui, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4516-4522.





Lukinmaa, S. , K. Aarnisalo, M.-L. Suihko, and A. Siitonen. 2004. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Clinical Microbiology and Infection* 10, no. 6: 562-568.

Lukinmaa, S. , U. M. Nakari, M. Eklund, and A. Siitonen. 2004. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food borne bacterial pathogens. *APMIS* 112, no. 11-12: 908-929.

## M

---

McAuliffe, O., C. Hill, and R. P. Ross. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 86, no. 2: 251-256.

McKellar, R. C., Lu, X., and Knight, K. P., 2002. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73, 127-135.

McMeekin, T. A., K. Presser, D. Ratkowsky, T. Ross, M. Salter, and S. Tienungoon. 2000. Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology* 10, no. 55: 93-98

McSweeney, P. L. H., and M. J Sousa. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait* 80: 293-324

Maisnier-Patin, S., E. Forni, and J. Richard. 1996. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* 30, no. 3: 255-270.

Maisnier-Patin, S., and J. Richard. 1996. Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. *FEMS Microbiology Letters* 140, no. 1: 29-35.

Maoz, A., R. Mayr, and S. Scherer. 2003. Temporal Stability and Biodiversity of Two Complex Antilisterial Cheese-Ripening Microbial Consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 7: 4012-4018.

Marshall, D. L., and R. H. Schmidt. 1991. Physiological evaluation of stimulated growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas species* in milk. *Canadian Journal of Microbiology* 37, no. 8: 594-599.

Margolles, A., A. Rodriguez, and C. G. De los reyes-Gavilan. 1997. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and cold storage of Afuega'l OPitu cheese. *Journal of Food Protection* 60, no. 6: 689-693.

Margolles, A. , B. Mayo, and C. G. de los Reyes-Gavilan. 2000. Phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. *Food Microbiology* 17, no. 4: 461-467.

Matak, K. E. , J. J. Churey, R. W. Worobo, S. S. Sumner, E. Hovingh, C. R. Hackney, and M. D. Pierson. 2005. Efficacy of UV light for the reduction of *Listeria monocytogenes* in goat's milk. *Journal of Food Protection* 68, no. 10: 2212-2216.



- Mayeux, J. V., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 45: 655.
- Mead, G. C. and Adams, B. W. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *Br. Poult. Sci.* 1977; 18(6):661-670.
- Membre, J. M., J. Thurette, and M. Catteau. 1997. Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 82, no. 3: 345-350.
- Meyer-Broseta, S.; Diot, A.; Bastian, S.; Riviere, J., and Cerf, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 80(1):1-15.
- Millet L., Lamoine L., Jouinot M. and Montel M.C. 2002. Typage moléculaire de *L. monocytogenes* pour retracer l'origine des contaminations dans une filière fromagère. *Congrilaît*. Paris.
- Mira-Gutierrez, J., C. Perez de Lara, and M. A. Rodriguez-Iglesias. 1990. Identification of species of the Genus *Listeria* by fermentation of carbohydrates and enzymatic patterns. *Acta Microbiologica Immunol Hungarica* 37, no. 1: 123-129.
- Molimard, P., and H. E. Spinnler. 1996. Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79: 169-184.
- Monk, J. David 1, Ma. Rocelle S. 1 Clavero, Larry R. 1 Beuchat, Michael P. 1 Doyle, and Robert E. 1 Brackett. 1994. Irradiation Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Low- and High-fat, Frozen and Refrigerated Ground Beef. *Journal of Food Protection* 57: 969-974.
- Morgan, F., V. Bonnin, M-P. Mallereau, and G. Perrin. 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology* 64, no. 1-2: 217-221.
- Mossel, D. A. A.; Visser, M., and Merrgerinsk, W. H. J. A comparaison of media for the enumeration of moulds and yeasts in food and beverages. *Lab. Proct.* 1962; 11109-11112.
- Mulder, E. G., and Antheunisse. J. 1963. Morphologie, Physiologie et écologie des *Arthrobacter*. *Annales De L' Institut Pasteur* 105: 46-74.

## N

---

- Nunez, M., J. L. Rodriguez, E. Garcia, P. Gaya, and M. Medina. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 83, no. 6: 671-677.

## O

---

- Ogier, J. C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, and A. Delacroix-Buchet. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, no. 8: 3691-3701.



- Olarte, C.; Gonzalez-Fandos, E.; Gimenez, M.; Sanz, S., and Portu, J. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Cameros cheese) packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*. 2002; 19(1):75-82.
- Olarte, C.; Sanz, S.; Gonzalez Fandos, E., and Torre, P. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *Journal of Applied Microbiology*. 2000;88(3):421-429.
- Olasupo, N. A., U. Schillinger, A. Narbad, H. Dodd, and W. H. Holzapfel. 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *International Journal of Food Microbiology* 53, no. 2-3: 141-152
- Ouadghiri, M. , M. Amar, M. Vancanneyt, and J. Swings. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters* 251: 267-271.
- O'Sullivan, L., E. B. O'Connor, R. P. Ross, and C. Hill. 2006. Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 100, no. 1: 135-143.

## P

---

- Papageorgiou, D. K., and E. H. Marth. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. *Journal of Food Protection* 52, no. 9: 625-630.
- Papageorgiou, D. K., and E. H. Marth, 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* during the Manufacture, Ripening and Storage of Feta Cheese. *Journal of Food Protection* 52, no. 2: 82-87.
- Patterson, M. 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology* 8, no. 5: 181-184.
- Pearson, L. J. and Marth, E. H. *Listeria monocytogenes*--threat to a safe food supply: a review. *Journal of Dairy Science*. 1990; 73(4):912-928; ISSN: 0022-0302.
- Peterson, S. D., and R. T. Marshall. 1990. Nonstarter Lactobacilli in Cheddar Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science* 73, no. 6: 1395-1410.
- Petran, R. L., and E. A. Zottola. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science* 54: 458-460.
- Phan-Thanh, L., F. Mahouin, and S. Alige. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 55, no. 1-3: 121-126.
- Pine, L., G. B. Malcolm, J. B. Brooks, and M. I. Daneshvar . 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal of Microbiology* 35, no. 2: 245-54.
- Pinheiro, J. C. and Bates, D. M. Mixed effects models in S and S-plus. New York: Springer Verlag; 2000.
- Pitt, W.M., Harden, T.J. and Hull, R.R., 2000. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 63, 916-920.
- Premaratne, R. J., W. J. Lin, and E. A. Johnson. 1991. Development of an improved chemically defined



minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, no. 10: 3046-3048.

## R

---

- Ramsaran, H. , J. Chen, B. Brunke, A. Hill, and M. W. Griffiths. 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* 81, no. 7: 1810-1817.
- Rasch, M., and S. Knochel. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, peidocin PA-1 and bavaricin A. *Letters in Applied Microbiology* 27: 275-278.
- Ratomahenina, R., S. Van den Boom, S. Galzy, and B. Dieu. 1995. Study of growth parameters of *Cylindrocarpum* sp., a mould isolated from Saint-Nectaire cheese. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm* 17, no. 5-6 : 169-171.
- Reij, M. W., and E. D. Den Aantrekker. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* 91, no. 1: 1-11.
- Rocourt, J., and P. Cossart. 1997. *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*: 337-352.
- Rodriguez, E., J. Calzada, J. L. Arques, J. M. Rodriguez, M. Nunez, and M. Medina. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15, no. 1: 51-57.
- Rogga, K. J., J. Samelis, A. Kakouri, M. C. Katsiari, I. N. Savvaids, and M. G. Kontominas. 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. *International Dairy Journal* 15, no. 1: 59-67.
- Rosso, L., J. R. Lobry, and J. P. Flandrois. 1993. An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. *Journal of Theoretical Biology* 162, no. 4: 447-463.
- Rudolf, M., and S. Scherer. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 63, no. 1-2: 91-98.
- Ryser, E. T., S. M. Arimi, M. M. Bunduki, and C. W. Donnelly. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. *Applied and Environmental Microbiology* 62, no. 5: 1781-1787.
- Ryser, E. T. , and E. H. Marth. 1987. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 50, no. 1: 7-13.
- Ryser, E.T.. 1987. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50, no. 5: 372-378.

## S

---

- Samelis, J., A. Kakouri, K. J. Rogga, I. N. Savvaids, and M. G. Kontominas. 2003. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4[deg]C in vacuum packages. *Food Microbiology* 20, no. 6: 661-669.
- Schaack, M. M., and E. H. Marth. 1988. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation





with mesophilic lactic starter cultures. *Journal of Food Protection* 51: 600-606.

- Schubert, K., W. Ludwig, N. Springer, R. M. Kroppenstedt, J. P. Accolas, and F. Fiedler. 1996. Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, no. 1: 81-87.
- Schubert, K., D. Reiml, J. P. Accolas, and F. Fiedler. 1993. A novel type of meso-diaminopimelic acid-based peptidoglycan and novel poly(erythritol phosphate) teichoic acids in cell walls of two coryneform isolates from the surface flora of French cooked cheeses. *Archives of Microbiology* 160, no. 3: 222-228.
- Siragusa, G. R., and M. G. Johnson. 1989. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antimicrobial system. *Applied and Environmental Microbiology* 55, no. 11: 2802-2805.
- Slanetz, L. C. W., and C. H. Bartley. 1957. Numbers of enterococci in water, Sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* 74: 591-596.
- Song, H. J., and J. Richard. 1997. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of Food Microbiology* 36, no. 2-3: 155-161.
- Solano-Lopez, C., and H. Hernandez-Sanchez. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 62, no. 1-2: 149-153.
- Sorrels, K. M., D. C. Enigi, and J. R. Hatfield. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52: 571-573.
- Stecchini, M. L., R. Di Luch, G. Bortolussi, and M. Del Torre. 1996. Evaluation of lactic acid and monolaurin to control *Listeria monocytogenes* on Stracchino cheese. *Food Microbiology* 13, no. 6: 483-488.

## T

---

- Tagg, J. R., and A. R. McGiven. 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21, no. 5: 943.
- Teixeira, L. M., V. L. Merquior, M. da C. E. Vianni, M. da G. S. Carvalho, S. E. L. Fracalanza, A. G. Steigerwalt, Don J. Brenner, and R. R. Facklam. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, no. 3: 664-668.
- Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29: 807-813.
- Tienungoon, S.; Ratkowsky, D. A.; McMeekin, T. A., and Ross, T. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66(11):4979-4987.
- Thierry, A. 2007. L'éthanol et l'arôme fruité de l'emmental. [www.inra.fr/cepia/docgen/docpresse](http://www.inra.fr/cepia/docgen/docpresse)



Tornadijo, M. E., M. C. Garcia, J. M. Fresno, and J. Carballo. 2001. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simon cheese. *Food Microbiology* 18, no. 5: 499-509.

Turner, N., W. E. Sandine, P. R. Elliker, and E. A. Day. 1963. Use of tetrazolium dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* 46: 380-385.

## V

---

Vafopoulou-Mastrogiannaki, A., E. Litopoulou-Tzanetaki, and N. Tzanetakis. 1990. Effect of *Pediococcus pentosaceus* on ripening changes of feta cheese. *Microbiologie - Aliments - Nutrition* 8, no. 1: 53-62.

Valdes-Stauber, N., S. Scherer, and H. Seiler. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 34, no. 2: 115-129.

Vasquez, A., S. Ahrne, B. Pettersson, and G. Molin. 2001. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Letters in Applied Microbiology* 32, no. 4: 215-219.

Vasseur, C., L. Baverel, M. Hebraud, and J. Labadie. 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 86, no. 3: 469-476.

Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria Pathogenesis* and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, no. 3: 584-640.

Vela, A. I., J. Vazquez, A. Gibello, M. M. Blanco, M. A. Moreno, P. Liebana, C. Albendea, B. Alcala, A. Mendez, L. Dominguez, and J. F. Fernandez-Garayzabal. 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. *J. Clin. Microbiol.* 38, no. 10: 3791-3795.

Vergeade, J., J. Guiraud, and J. P. Larpent. 1976. Etude de la flore de levure du Saint-Nectaire. *Lait* 555-556: 275-285.

Villani, F., M. Aponte, G. Blaiotta, G. Mauriello, O. Pepe, and G. Moschetti. 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *Journal of Applied Microbiology* 90: 430-439.

Villani, F., and S. Coppola. 1994. Selection of enterococcal strains for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 44, no. 1: 97-105.

Villani, F., O. Pepe, G. Mauriello, G. Moschetti, L. Sannino, and S. Coppola. 1996. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the traditional manufacture of water buffalo Mozzarella cheese. *Letters in Applied Microbiology* 22, no. 5: 357-360.

Vogensen, F. K., Karst, T., Larsen, J. J., Kringelum, B., Ellekjaer, D. and Nielsen, E. W., 1987. Improved direct differentiation between *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Streptococcus cremoris*/ *Streptococcus lactis* on agar. *Milchwissenschaft* 42, 646-648.



Voegas, C. A., and I. Sa-Correia. 1991. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic. *Journal of General Microbiology* 137: 645-651.

## W

---

Wan, J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcook, MVW. Hickey, and MJ. Coventry. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology* 82, no. 3: 273-280.

Wang, L L, and E A Johnson. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology* 58, no. 2: 624-629.

Welsh, F. W., Murray, W.D. and Williams, R.E. 1989. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical reviews in biotechnology* 9:105-169

Wenzel, J. M., Marth, E. H., 1990. Changes in Populations of *Listeria monocytogenes* in a Medium with Internal pH Control Containing *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* 73, 3357-3365.

## Y

---

Yousef, A. E., and E. H. Marth. 1990. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of parmesan cheese. *Journal of Dairy Science* 73: 3351-3356.

## Z

---

Zapico, P., M. Medina, P. Gaya, and M. Nunez. 1998. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 40, no. 1-2: 35-42.

Zumstein, E., R. Moletta, and J. J. Godon. 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Environmental Microbiology* 2, no. 1: 69-78



# **ANNEXES**





## ANNEXE 1

### Conditions de culture, de conservation et de décongélation des souches microbiennes utilisées pour reconstituer les différentes combinaisons microbiennes

groupe taxonomique	espèces microbiennes	conditions de culture			reprise des cultures après centrifugation	répartition en cryotubes	congélation	décongélation
		bouillon	T°C	temps(j)				
<b>A</b> <b>Bactéries lactiques</b>	<i>Lactobacillus casei</i>	MRS	30	3	Lait glycérolé (15%) additioné de 0,5%d'ascorbate	1,5 ml/cryotube. Temps de contact de la suspension bactérienne avec le glycérol: 15 à 30 min	passage de la température ambiante à -80°C directement	5 min à 30°C au bain marie (homogénéisation manuelle)
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	MRS	30	3				
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS	30	3				
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	30	3				
	<i>Lactobacillus farciminis</i>	MRS	30	3				
	<i>Leuconostoc citreum</i>	BHI	30	2-3				
	<i>Ln pseudomesenteroides</i>	BHI	30	2-3				
	<i>Enterococcus faecalis</i>	M17	42	2				
	<i>Enterococcus hirae</i>	M17	42	2				
<b>B</b> <b>Bactéries non lactiques à Gram positif</b>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	BHI	37	1	Lait glycérolé (15%) additioné de 0,5%d'ascorbate	1,5 ml/cryotube. Temps de contact de la suspension bactérienne avec le glycérol: 15 à 30 min	passage de la température ambiante à -80°C directement	5 min à 30°C au bain marie (homogénéisation manuelle)
	<i>Staphylococcus equorum</i>	BHI	37	1				
	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	BHI	30	3				
	<i>Microbacterium sp.</i>	BHI	25	3				
	<i>Corynebacterium flavesces</i>	BHI	25	10				
	<i>Corynebacterium casei</i>	BHI	25	10				
	<i>Brevibacterium linens</i>	BHI	25	10				
	<i>Exiguobacterium</i>	BHI	25	3				
	<i>Kocuria rhizophilia</i>	BHI	25	3				
	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	BHI	30	3				
<b>C</b> <b>Bactéries à Gram négatif</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	BHI	30	3	Lait glycérolé (15%)	1,5 ml/cryotube. Temps de contact de la suspension bactérienne avec le glycérol: 15 à 30 min	passage de la température ambiante à -80°C directement	5 min à 30°C au bain marie (homogénéisation manuelle)
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	BHI	30	3				
	<i>Commamonas testosteroni</i>	BHI	25	3				
	<i>Acinetobacter</i>	BHI	30	3				
	<i>Chryseobacterium sp</i>	BHI	30	3				
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BHI	30	3				
<b>D</b> <b>Levures</b>	<i>Rhodosp. babjevae</i>	OGA	25	3-4	Lait glycérolé (15%)	1,5 ml/cryotube. Temps de contact de la suspension bactérienne avec le glycérol: 15 à 30 min	1h à 4°C puis passage à -80°C	5 min à 37°C au bain-marie (homogénéisation manuelle)
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	OGA	25	3-4				
	<i>Candida pseudointermedia</i>	OGA	25	3-4				
	<i>Candida pararugosa</i>	OGA	25	3-4				
	<i>Candida deformans</i>	OGA	25	3-4				

Groupe A : groupe des bactéries lactiques, Groupe B : groupe des bactéries non lactiques à Gram positif, Groupe C : groupe à Gram négatif, Groupe D : levures

*Ln* : *Leuconostoc*, *sp* : *species*, *Rhodosp* : *Rhodospiridium*

T°C : température en degrés Celsius, J : jours

MRS : Man Rogosa et Sharpe, BHI : Brain Heart Infusion, OGA : Oxytetracycline Glucose Agar (FIL-IDF 94B, 1991), M17: milieu 17 (Terzaghi *et al.*, 1975)



## ANNEXE 2

### Milieux de repiquage des isolats

Les températures et temps d'incubation des colonies dans le milieu de repiquage sont ceux du milieu d'origine (milieu sur lequel les colonies ont été prélevées).

Milieu de prélèvement des isolats	Milieu de repiquage
Medium 17 (M17) 30°C	M17
M17 42°C	M17
Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF)	Brain Heart Infusion (BHI)
Slanetz Bartley (SB)	M17
Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)	Potato Dextrose Agar (PDA)
Cephalidine Fucidine Cetramidine (CFC)	BHI
Facultatively Heterofermentative (FH)	Man Rogosa et Sharpe (MRS)
Turner (T)	M17
Turner + acide nalidixique (T+a.n.)	M17
Plate Count Agar + lait (PCA+L)	BHI
PCA+L+inhibiteur de bactéries à Gram+ (PCA+L+I)	BHI
Nikels and Leesment (NL)	M17
Mayeux Sandine Elikar (MSE)	M17
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	BHI
Violet red Bile Glucose (VRBG) agar	BHI



## ANNEXE 3

### Composition des milieux de cultures

#### GELOSE M17

##### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose M17 est utilisée pour le dénombrement des Streptocoques lactiques dans les produits laitiers. Les différents constituants du milieu permettent une meilleure croissance des microorganismes à dénombrer. Le lactose est fermenté en acide lactique, neutralisé par le glycérophosphate.

##### Documents de références

Terzaghi, B.E. et Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, *Applied Microbiology*, 29, 807-813.

##### Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 57,2 g de milieu prêt à l'emploi (BK 088)

OU peser :

- 2,5 g de tryptone
- 2,5 g de peptone trypsique de viande
- 5,0 g de peptone papaïque de soja
- 2,5 g d'extrait de levure
- 5,0 g d'extrait de viande
- 5,0 g de lactose
- 19,0 g de glycérophosphate de sodium
- 0,25 g de sulfate de magnésium
- 0,5 g d'acide ascorbique
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 20 min à 115°C.

Refroidir à 48°C et couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

##### Incubation

Pour dénombrer les streptocoques thermophiles, les boîtes sont incubées à 42°C 24H.

Pour dénombrer les streptocoques mésophiles, les boîtes sont incubées à 30°C 48H.

##### Lecture

Compter toutes les colonies de la boîte.



## GELOSE OGA : Oxytétracycline Gélose Agar

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose OGA est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et moisissures dans les produits laitiers et les produits cosmétiques.

La croissance des levures et des moisissures est favorisée en présence de glucose et d'extrait de levure. L'addition extemporanée d'oxytétracycline permet d'inhiber les bactéries.

### Documents de références

FIL-IDF 94 B, 1991. Lait et produits laitiers. Dénombrement des levures et des moisissures. Comptage des colonies à 25°C.

### Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 22,0 g de milieu prêt à l'emploi (BK 053)

OU peser :

- 5,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g d'extrait de viande
- 20,0 g de glucose
- 1,08 g de tween 80
- 2,0 g de phosphate dipotassique
- 5,0 g d'acétate de sodium
- 2,0 g de citrate d'ammonium
- 0,20 g de sulfate de magnésium
- 0,05 sulfate de manganèse
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 min à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec la totalité du lyophilisat d'oxytétracycline replit dans 5 ml d'eau stérile (pour 550 ml de milieu gélosé).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 25°C pendant 3 à 5 jours.

### Lecture

Compter séparément les levures et les moisissures.





## GELOSE SB : Slanetz et Bartley

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose SB est un milieu sélectif pour le dénombrement des entérocoques.

L'azide de sodium permet d'inhiber la croissance des microorganismes à Gram négatif et le TTC (chlorure de triphényltétrazolium) est un inhibiteur de la croissance bactérienne. Il est réduit par les entérocoques en un formazan insoluble dans la cellule qui se manifeste par l'apparition d'une pigmentation rouge à marron des colonies.

### Documents de références

Slanetz, L.W. et Bartley, C.H., 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and faeces determined by the Membrane Filter Technique with an improved medium, *Journal of Bacteriology*, 74 (5), 591.

### Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 41,4 g de milieu prêt à l'emploi (BK 129)

OU peser :

- 5,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g d'extrait de viande
- 20,0 g de glucose
- 1,08 g de tween 80
- 2,0 g de phosphate dipotassique
- 5,0 g d'acétate de sodium
- 2,0 g de citrate d'ammonium
- 0,20 g de sulfate de magnésium
- 0,05 sulfate de manganèse
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 20 min à 110°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec 10 ml de TTC 1% pour 990 ml de milieu gélosé maintenu à 48°C (5 ml si 495 ml de gélose). Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 42°C pendant 48 H.

### Lecture

Compter les colonies rouges (qui réduisent le TTC) de la boîte.



## GELOSE CFC : Céphalosporine Fucidine Cétrimide

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu Céphalosporine Fucidine Cétrimide est un milieu sélectif pour l'isolement et le dénombrement des *Pseudomonas* pigmentés et non pigmentés.

La céphalosporine permet d'inhiber la majeure partie des germes contaminants et plus particulièrement les entérobactéries, les staphylocoques et les streptocoques. La fucidine inhibe le développement des *Acinetobacter* / *Moraxella* sans intervenir sur la croissance des *Pseudomonas*. Les levures contaminantes sont inhibées par le cétrimide. Ces trois composés sont apportés extemporanément.

### Documents de références

NF V 04-504, 1988. Viande et produits à base de viande. Dénombrement des *Pseudomonas*.

### Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 24,7 g de milieu prêt à l'emploi (BK 118)

OU peser :

- 16,0 g de peptone pancréatique de gélatine
- 10,0 g de tryptone
- 10,0 g de sulfate de potassium
- 1,4 g de chlorure de magnésium
- 12,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 mins à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec la totalité du lyophilisat de supplément sélectif (BS 02208) replit dans 5 ml d'eau stérile. Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 25°C pendant 48 à 72 heures.

### Lecture

Dénombrer les colonies pigmentées et fluorescentes.



## GELOSE PCA-lait additionné d'inhibiteurs de bactéries à Gram positif

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu PCA-lait (Plate Count Agar + lait) est utilisé pour le dénombrement des micro-organismes de la flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR) des produits laitiers. L'ajout de cristal violet et d'antibiotique, tel que la vancomycine, permet d'éliminer la flore Gram positif.

Les différents constituants du milieu permettent une meilleure croissance des microorganismes à dénombrer. Le cristal violet inhibe le développement de la flore Gram positif. De même la vancomycine agit contre les microorganismes à Gram positif tels que les staphylocoques, les pneumocoques, les streptocoques, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium* et les entérocoques.

### Documents de références

FIL-IDF 100B, 1991

### Préparation

Pour 1 L de milieu peser :

- 20,5 g de PCA prêt à l'emploi
- 3,0 g d'agar agar bactériologique

Répartir en flacon à raison de 495 ml/ flacon

Autoclaver le milieu obtenu 20 mins à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec 5 ml de lait écrémé reconstitué stérile (10% : 10g de poudre/ 100 ml d'eau), 0,25 ml de solution de cristal violet (1% : 10mg/ml) et 0,5 ml de solution de vancomycine (0,5% : 5mg/ml).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 3 jours.

### Lecture

Compter toutes les colonies.



## GELOSE VRBG : gélose Glucosée au cristal Violet et au Rouge neutre

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose VRBG est utilisée pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits laitiers et autres produits alimentaire.

La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries non recherchées. La dégradation du glucose en acide est révélée par le virage au rouge de l'indicateur de pH : le rouge neutre.

### Documents de références

NF V 08-021. Décembre 1985. Directives générales pour le dénombrement sans revivification des *Enterobacteriaceae*. Technique NPP et méthode par comptage des colonies.

### Préparation

Pour **1 L** de milieu :

- **39,5 g** de milieu prêt à l'emploi (BK 011)

OU peser :

- 7,0 g de peptone pepsique de viande
- 3,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g de glucose
- 1,5 g de sels biliaires
- 5,0 g de chlorure de sodium
- 0,030 g de rouge neutre
- 0,002 g de cristal violet
- 13,0 g d'agar agar bactériologique

Porter à ébullition lentement, jusqu'à dissolution complète des poudres, dans un bain marie à 100°C.

Maintenir l'ébullition pendant 20 minutes.

Refroidir à 48°C. Ensemencer dans la masse (12 ml de gélose) 1 ml de produit à analyser, laisser solidifier et couler une sur-couche (4 ml de gélose).

### Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 24 à 48 H.

### Lecture

Compter les colonies rouges de plus de 1 mm de diamètre.





## GÉLOSE CRBM: Cheese Ripening Bacteria Medium

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu gélosé CRBM est utilisé pour le dénombrement des bactéries d'affinage dans un ensemble. Les différents constituants du milieu permettent une meilleure croissance des micro-organismes à dénombrer. La pimarinine et l'acide nalidixique permettent d'éliminer de la flore fongique des bactéries Gram- et des *Bacillus*.

### Documents de références

Denis, C., Gueguen, M., Henry, E. et Levert, D., 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria, *Lait*, 81, 365-379.

### Préparation

Pour 1 L de milieu peser :

- 5,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 33,4 g de lactate de sodium à 60%
- 2,0 g de  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 10,0 g de tryptone
- 7,0 g d'extrait de levure
- 50,0 g de NaCl
- 1,0 g de Tween 80
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Ajuster le pH à 7,3

Répartir en flacon à raison de 495 ml/ flacon

Autoclaver le milieu obtenu 15 min à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec 0,5 ml de solution de pimarinine (1,8% : 1,8 g dans 100 ml d'eau stérile) et 5 ml d'acide nalidixique (0,4% : 0,4 g d'acide nalidixique dans 100 ml de DMSO).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 25°C pendant 5 jours puis 10 jours environ à température ambiante.

### Lecture

Compter toutes les colonies à 5 jours puis à 10 jours.



## GELOSE FH : Facultatif Hétérofermentaire

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose FH est utilisée pour le dénombrement des lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs.

### Documents de références

Isolini, D., Grand, M. et Glättli, H., 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen, *Schweiz. Milchw. Forschung*, 19 (3), 57-59.

### Préparation

Préparation du tampon acétate (1M, pH : 5,40) :

- 151,3 g d'acétate de sodium trihydrate
- 11,9 g d'acide acétique 100% (ou 11,3 ml)
- 1000 g d'eau déminéralisée

Pour 1 L de milieu peser :

- 10,0 g de peptone pancréatique de caséine
- 10,0 g d'extrait de viande
- 1,0 g d'extrait de levure
- 20,0 g de mannitol
- 0,1 g de Mg SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O
- 0,1 g de Mg SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O
- 3,0 g de Tween 80
- 15,0 g d'agar agar bactériologique
- 200 ml de tampon acétate

Autoclaver le milieu obtenu 15 min à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec 10 ml de solution de vancomycine à 5 g/L (soit 0,25 g dans 50 ml d'eau).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 72 heures en anaérobiose.

### Lecture

Compter toutes les colonies.



## GELOSE MSE : Mayeux Sandine et Elliker

### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose MSE est un milieu sélectif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostocs* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés.

A partir du saccharose du milieu, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc dextranicum* synthétisent des polysaccharides (dextranes) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux.

### Documents de références

Mayeux, J.V., Sandine, W.E. et Elliker, P.R., 1962. Aselective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures, *Journal of Dairy Science*, 45, 655.

### Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 138,5 g de milieu prêt à l'emploi (BK 087)

OU peser :

- 10,0 g de tryptone
- 2,5 g de gélatine
- 5,0 g d'extrait autolytique de levure
- 100,0 g de saccharose
- 5,0 g de glucose
- 1,0 g de citrate d'ammonium
- 0,075 g d'azide de sodium
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 20 mins à 110°C.

Refroidir à 48°C et couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 48 à 72 h.

### Lecture

Compter toutes les colonies de la boîte en distinguant les dextrane+ (gélatineuses) et les dextranes-.



### Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu RPF permet la détection et la numération directe des staphylocoques à coagulase + dans les prélèvements biologiques, les produits alimentaires et les produits laitiers.

La croissance des staphylocoques est favorisée par le pyruvate de sodium et la glycine. La microflore secondaire est inhibée en présence de chlorure de lithium, de tellurite de potassium (ajouté extemporanément), ainsi que par la forte concentration en glycine. Les *Staphylococcus aureus* se caractérisent par la présence de colonies noires par réduction du tellurite en tellure et sont entourées d'un halo d'éclaircissement du plasma.

### Documents de références

Baird Parker, A.C., 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci, *Journal of Applied Bacteriology*, 25, 12-19.

De Buyser, M.L., Lambard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, P., Lahellec, C., 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2 : 1999 -- Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 83 (2), 185-194.

### Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 52,2 g de milieu prêt à l'emploi (BK 055 HA : Baird-Parker)

OU peser :

- 10,0 g de tryptone
- 5,0 g d'extrait de viande
- 1,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g pyruvate de sodium
- 12,0 g de glycine
- 5,0 g de chlorure de lithium
- 15,0 g d'agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 mins à 121°C.

Refroidir à 48°C et compléter avec la totalité de 10 flacons de lyophilisat de supplément sélectif (BS 03408) repris dans 10 ml d'eau stérile/flacon.

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

### Incubation

Incuber les boîtes à 37°C pendant 48 heures.

### Lecture

*Staphylococcus aureus* se caractérise par la formation de colonies noires, brillantes, convexes, entourées d'un halo d'éclaircissement du plasma. Les staphylocoques à coagulase – sont presque totalement inhibés ; toutefois si une culture apparaît, les zones d'éclaircissement sont absentes.

Dénombrer toutes les colonies en séparant celles qui présentent un halo d'éclaircissement.





## ANNEXE 4 : PUBLICATIONS, COMMUNICATION, ENSEIGNEMENT

### Publications périodiques à comité de lecture

---

Saubusse M., Millet L., Delbès C., Callon C., Montel M.C. 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism – PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. **116** 126-135

Millet L., Saubusse M., Didienne R., Tessier L., Montel M.C., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. **108**: 105-114

### Communications courtes dans congrès sous forme de posters

---

Saubusse M., Bega de Paiva M., Callon C. and Montel M.C., 2006. Complex microbial community of cheeses: a trump for the inhibition of *Listeria monocytogenes*? The 20th international ICFMH symposium, Bologna, Italy

Saubusse M., Millet L., Delbès C., and Montel M.C., 2005. Interactions *Listeria monocytogenes* - flores d'intérêt technologique dans un fromage de type pâte pressée non cuite. *2ème Colloque d'Ecologie Microbienne*, Obernai.

Millet, L., Saubusse, M., Delbès, C., and Montel, M.C., 2004. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Congress of Cheese Technology*, Prague.

### Communications orales

---

Saubusse M., Millet L., Delbès C., Callon C. Didienne R. and Montel M.C. Interactions *Listeria monocytogenes*-flores d'intérêt technologique dans un fromage de type pâte pressée non cuite.

*Journées de l'Ecole Doctorale*, Clermont-Ferrand, mars 2006

Saubusse M., Millet L., Delbès C., Callon C. and Montel M.C. Les écosystèmes microbiens peuvent-ils inhiber le développement de *Listeria monocytogenes* dans les filières fromagères traditionnelles ? Cas du fromage A.O.C Saint-Nectaire.

*Colloque produits fermiers*, Clermont-Ferrand, 1<sup>er</sup> avril 2005

*Rencontre des microbiologistes*, Clermont-Ferrand, décembre 2004

*Réunion AQS*, Paris, février et mai 2004



## Travaux co-encadrés

---

### Mémoire d'ingénieur

Bega de Paiva M., 2006: Does the raw-milk indigenous microflora constitute an hurdle for *Listeria monocytogenes* development in cheeses? Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de Sao Paulo (ESALQ/USP)-Brasil

### Mémoire d'IUT

Dufour C., 2005 : Quelles sont les populations microbiennes d'un fromage au lait cru de type Saint-Nectaire associées à une inhibition de *Listeria monocytogenes* ? IUT Génie Biologique –15000 Aurillac

## Activités d'enseignement

---

2006 : Travaux dirigés de microbiologie (9 heures) pour les élèves de première année de l'IUT Génie Biologique d'Aurillac.

2005 : Travaux pratiques de microbiologie (48 heures) pour les élèves de première année de l'IUT Génie Biologique d'Aurillac.



---

## RESUME

Dans la perspective de maîtriser la qualité sanitaire des fromages au lait cru, cette thèse avait pour objectif de déterminer si et comment les populations microbiennes des laits crus pouvaient faire barrière à *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite. La comparaison des profils microbiens SSCP de fromages avec et sans développement de *L. monocytogenes* a permis d'identifier les pics de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus. garvieae*, *Enterococcus saccharominimus*, *Enterococcus faecium*, *Chryseobacterium sp.* et *Corynebacterium flavescens* uniquement dominants dans les profils microbiens des fromages inhibiteurs. *Lc. lactis* s'est révélée le plus inhibiteur en fromages par production d'acide lactique en début d'affinage. L'inventaire des populations du lait cru le plus inhibiteur a permis de reconstituer une communauté de 32 espèces réparties en 4 groupes – bactéries lactiques, bactéries non lactiques à Gram positif, bactéries à Gram négatif et levures. L'application de la technique de SSCP sur l'ADN extrait des fromages ou des communautés microbiennes cultivées sur différents milieux s'est révélée insuffisante pour évaluer l'implantation de toutes les populations microbiennes et mettre en évidence des interactions entre elles. Cependant, par omission successive des groupes microbiens de cette communauté, il a pu être montré que le groupe des bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) agissaient en synergie avec les bactéries à Gram positif non lactiques dans l'inhibition de *L. monocytogenes*. Le rôle des levures dans l'inhibition serait moindre et les bactéries à Gram négatif n'interviendraient pas. En cours d'affinage, l'inhibition serait plutôt attribuée à la production d'acides organiques (D-lactate, acétate), d'alcools (1-pentanol, 2-propanol, 2-butanol) et de certains esters (éthyl formiate, éthyl acétate).

---

## SUMMARY

In order to control the sanitary quality of raw milk cheeses, this thesis aimed to determine if and how the microbial populations of raw milks could act as a barrier against *Listeria monocytogenes* in a Saint-Nectaire cheese type technology. The comparison of SSCP profiles of cheeses with and without development of *L. monocytogenes* allowed to identify the peaks of *Lactococcus lactis*, *Lactococcus. garvieae*, *Enterococcus saccharominimus*, *Enterococcus faecium*, *Chryseobacterium sp.* and *Corynebacterium flavescens* only dominant in the microbial profiles of inhibitory cheeses. *Lc. lactis* appeared to be the most inhibitory in cheeses at the beginning of ripening by lactic acid production. The inventory of the populations of the most inhibitory raw milk allowed to reconstitute a community of 32 species divided into 4 groups: lactic bacteria, Gram positive non lactic bacteria, Gram negative bacteria and yeasts. The application of the SSCP technique, on the DNA extracted from cheeses or from the microbial communities cultivated on various media, was insufficient to evaluate the establishment of all the microbial populations and to highlight interactions between them. However, by successive omission of the microbial groups of this community, it was shown that the group of the lactic bacteria (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) acted in synergy with the Gram positive non lactic bacteria in *L. monocytogenes* inhibition. The role of the yeasts in the inhibition would be less and the Gram negative bacteria would not intervene. During the ripening, the inhibition would be rather allotted to the production of organic acids (D-lactate, acetate), of alcohols (1-pentanol, 2-propanol, 2-butanol) and some esters (ethyl formate, ethyl acetate).

---