



HAL
open science

Reconstitution de communautés microbiennes complexes pour l'inhibition de *Listeria monocytogenes* à la surface de fromages à pâte pressée non cuite

Emilie Retureau

► To cite this version:

Emilie Retureau. Reconstitution de communautés microbiennes complexes pour l'inhibition de *Listeria monocytogenes* à la surface de fromages à pâte pressée non cuite. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2010. Français. NNT : 2010CLF22035 . tel-00719220

HAL Id: tel-00719220

<https://theses.hal.science/tel-00719220>

Submitted on 19 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.

ECOLE DOCTORALE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre 518

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Nutrition et Sciences des Aliments)

Soutenue le 8 juin 2010

Emilie RETUREAU

**Reconstitution de communautés microbiennes complexes
pour l'inhibition de *Listeria monocytogenes* à la surface de
fromages à pâte pressée non cuite**

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

Rapporteurs : Mme N. DESMASURES, HDR, Maître de Conférence, Université de Caen Basse Normandie
Mr E. BEUVIER, HDR, Ingénieur de Recherche, INRA, Poligny

Membre : Mme M. C. MONTEL, Directeur de Recherches, INRA, Aurillac, Directeur de thèse

Invité : Mr P. VEISSEIRE, Maître de Conférence, IUT, Aurillac

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Marie-Christine Montel, directeur de l'Unité de Recherches Fromagères de l'INRA d'Aurillac et directeur de thèse pour m'avoir accueilli au sein de l'unité et pour m'avoir aidé à mener à bien cette étude.

Merci à Mr Gérard Fonty, directeur de Recherches à l'Université Blaise Pascal, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury de thèse.

Merci à Mme Nathalie Desmases, Maître de conférence à l'Université de Caen Basse Normandie et Mr Eric Beuvier, directeur de Recherches à l'INRA de Poligny, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens également à remercier Mr Philippe Veisseire, Maître de conférence à l'IUT de Biotechnologies d'Aurillac, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. J'ai en plus eu la chance de travailler avec toi sur l'HPLC à l'URF et à l'IUT et même si on a un peu « galéré », je crois qu'on s'en est pas mal sorti au final ! Bon courage pour la suite des caractérisations de souches et encore merci pour ton aide et tes mots justes.

Merci au programme TRUEFOOD "Traditional United Europe Food" Integrated Project financed by the European Commission under the 6th Framework Programme for RTD (Contract n. FOOD-CT-2006-016264) - qui a financé cette thèse et à tous les membres du WP2 dont les travaux m'auront enrichi.

Je remercie aussi chaleureusement toute l'équipe de l'unité Génie et microbiologie des procédés alimentaire de l'INRA à Thiverval-Grignon pour leur accueil d'une semaine et en particulier Armelle Delile qui m'a consacré du temps pour me former aux dosages HPLC.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'URF pour leur amitié, leur aide et leur soutien dans les bons et les mauvais moments, durant ces années passées à Aurillac. J'aurai pu profiter avec vous d'un cadre idyllique de travail dans des locaux neufs ! Merci à tous pour votre contribution morale ou technique à ces travaux :

- René Lavigne pour les fabrications fromagères
- Robert Didienne pour les fabrications fromagères et la caractérisation des souches avec Philippe.
- Béatrice Desserre pour son amitié et son aide précieuse pour les analyses microbiologiques.
- Cécile Callon pour l'identification des levures et surtout pour avoir accepté de partager ton bureau avec moi. Je crois que moi comme toi, nous nous souviendrons longtemps de TRUEFOOD...Je garderai en mémoire ton empathie du stress qui m'aura en quelque sorte permis de me libérer en partie du mien (Cqfd Rennes !) et nos échanges sur les petites galères de manip... Je pense bien à toi pour la suite...
- Céline Delbès pour m'avoir formé à la SSCP et pour ses bons conseils.
- Françoise Monsallier et Isabelle Verdier pour leur soutien et leurs bons conseils.

Un clin d'œil particulier à Michèle Gauzins, toujours disponible pour régler les petits problèmes administratifs, les commandes pressées... Merci surtout pour ton amitié sincère et ton soutien durant ces années.

Merci au Pôle fromager, Sophie Hulin, Christelle.... Et Caroline Châtelard, j'aurais fait un peu parti de votre petite famille...

Je n'oublie pas non plus de remercier ma famille : papa, maman, Julie, Luis pour leur soutien à toute épreuve, même à 536 km ! Me voilà de retour maintenant !

Une pensée pour Caco, merci pour ton amitié indéfectible et vive le téléphone illimité !

Je n'oublie pas de remercier aussi tous mes amis « stagiaires » ou non, qui sont passés, restés ou repartis... Lucie, Elise, Pierre et Robin, l'année 2007 est gravée dans ma mémoire et tous les bons moments qu'on a passé ensemble ! Fanny, Caro, Delphine, un grand merci pour votre soutien, je crois que l'on ne se perdra pas de vue ! Et vive nos soirées gastronomiques et autres soirées fromages, et tous les bons moments passés ensemble ! Je vous souhaite bonne continuation et on se reverra, c'est sûr !

Enfin, bonne continuation à tous et vive le fromage au lait cru !

Sommaire

Liste des abréviations -----	13
Introduction -----	15
Etude Bibliographique -----	21
1. <i>Listeria monocytogenes</i> -----	21
1.1. Généralités sur <i>Listeria monocytogenes</i> -----	21
1.2. Pouvoir pathogène-----	21
1.2.1. Listériose-----	21
1.2.2. Virulence de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	23
1.3. <i>L. monocytogenes</i> dans les produits laitiers -----	27
1.3.1. Réglementation-----	27
1.3.2. Contamination des laits-----	27
1.3.3. <i>L. monocytogenes</i> dans les fromages -----	29
2. Les technologies de barrières -----	35
2.1. Facteurs physiques-----	37
2.1.1. Température-----	37
2.1.2. Traitements par les hautes pressions-----	41
2.1.3. Champs pulsés-----	41
2.1.4. Irradiations-----	43
2.2. Facteurs physico-chimiques-----	43
2.2.1. Teneur en NaCl-----	43
2.2.2. L'activité de l'eau (aw)-----	45
2.2.3. Le système lactoperoxydase-----	45
2.3. Facteurs liés à la vie microbienne-----	47
2.3.1. Méthodes culture dépendante des microorganismes-----	49
2.3.2. Méthodes moléculaires indépendantes de la culture -----	49
2.3.3. Les communautés microbiennes des fromages et propriétés anti-listeria associées-----	61
Matériels et Méthodes -----	109
1. Fabrication des fromages au lait pasteurisé -----	109
2. Préparation des consortiums inoculés à la surface des fromages -----	111
2.1. Préparation des consortiums complexes issus de croûtes de fromages fermiers St Nectaire-----	111
2.1.1. Préparation des 34 consortiums complexes issus de croûtes de fromages fermiers St Nectaire-----	111
2.1.2. Préparation de consortiums complexes issus de la propagation du consortium complexe TR15-----	111
2.1.3. Préparation de consortiums à partir des culots et surnageants issus du consortium complexe TR15-----	113
2.2. Préparation de communautés microbiennes reconstituées-----	113
2.2.1. Constitution de collections d'isolats issus du consortium complexe TR15-----	113
2.2.2. Identification des isolats-----	113

2.2.3. Clonage et séquençage du consortium complexe TR15-----	115
2.2.4. Propriétés anti-listeria des souches <i>in vitro</i> -----	117
2.2.5. Préparation et conservation des souches pour la constitution de consortiums-----	117
2.2.6. Reconstitution de consortiums à partir des souches de la collection-----	119
2.2.7. Préparation de consortiums à partir des pools d'isolats cultivables issus du consortium complexe TR15-----	121
3. Inoculation des surfaces des fromages fabriqués à partir de lait pasteurisé-----	121
3.1. Inoculation de <i>L. monocytogenes</i> -----	121
3.2. Inoculation des croûtes des fromages avec les différents consortiums-----	123
3.2.1. Inoculations des consortiums complexes-----	123
3.2.2. Inoculations des consortiums reconstitués-----	123
3.3. Affinage et prélèvements-----	125
4. Analyses microbiologiques-----	125
4.1. Dénombrements des flores microbiennes sur les milieux de cultures-----	125
4.2. Analyse des isolats bactériens des milieux de dénombrements CRBM et BHI-----	127
4.3. Analyse par Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-----	127
4.3.1. Préparation des acides nucléiques-----	127
4.3.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)-----	129
4.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose-----	129
4.3.4. Electrophorèse capillaire-----	131
4.3.5. Analyse des profils SSCP-----	131
5. Analyses physico-chimiques et biochimiques-----	131
5.1. Mesures de pH-----	131
5.2. Mesures des extraits secs-----	131
5.3. Dosages des sucres et acides organiques des croûtes de fromages par méthode enzymatique-----	133
5.4. Dosages des sucres et acides organiques par chromatographie liquide haute pression (HPLC)-----	133
5.4.1. Préparation des croûtes de fromages pour analyses HPLC-----	133
5.4.2. Analyse HPLC-----	133
6. Caractérisation des potentialités des souches issues de l'identification du consortium complexe TR15 à produire des acides organiques <i>in vitro</i>-----	135
6.1. Préparation du milieu fromager-----	135
6.2. Préparation des géloses milieu fromager ensemencées avec les souches du consortium complexe TR15 pour analyse HPLC-----	137
7. Analyses statistiques-----	137
RESULTATS-----	139
1. Propriétés anti-listeria de consortiums complexes issus de croûtes de fromages fermiers St Nectaire-----	139
1.1. Capacités inhibitrices des consortiums complexes -----	139
1.2. Comparaison des profils bactériens des 5 consortiums inhibiteurs sélectionnés-	143
2. Propriétés anti-listeria du consortium complexe TR15-----	147
2.1. Incidence du taux d'inoculum de <i>L. monocytogenes</i> sur son inhibition par le consortium TR15-----	147
2.2. Propagation du consortium TR15 à la surface des fromages-----	147

2.3. Propriétés anti-listeria de la fraction biochimique soluble du consortium microbien TR15 et des culots microbiens correspondants-----	149
3. Identification des populations microbiennes du consortium complexe TR15-----	153
3.1. Identification des microorganismes capables de se développer à la surface des fromages-----	153
3.2. Propriétés anti-listeria in vitro des isolats bactériens et levures constituant le consortium complexe TR15-----	155
4. Propriétés anti-listeria des consortiums reconstitués sur la surface du fromage modèle-----	155
4.1. Première série de reconstitution-----	155
4.1.1. Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> et pH-----	157
4.1.2. Dénombrements des flores microbiennes au cours de l'affinage-----	157
4.2. Deuxième série de reconstitution-----	161
4.2.1. Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> et pH-----	161
4.2.2. Evolution des flores microbiennes au cours de l'affinage-----	161
4.2.3. Comparaison de la flore à Gram positif sur milieu CRBM-----	163
4.2.4. Dosages des acides organiques et des sucres à la surface des fromages---	165
Article : Is microbial diversity an asset for inhibiting <i>Listeria monocytogenes</i> in raw milk cheeses ? Dairy Science and Technology-----	167
4.3. Troisième série de reconstitution-----	171
4.3.1. Préculture de la souche <i>Leuconsotoc</i> -----	171
4.3.2. Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> et pH-----	171
4.3.3. Evolution des flores microbiennes au cours de l'affinage-----	173
4.3.4. Concentrations en acides organiques et sucres à la surface des fromages-	177
4.4. Identification des isolats du consortium TR15 par méthodes cultures dépendantes et indépendantes-----	181
4.4.1. Identification des isolats après culture sur milieux gélosés-----	181
4.4.2. Clonage du consortium complexe TR15-----	183
4.5. Quatrième série de reconstitution-----	185
4.5.1. Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> et pH-----	185
4.5.2. Identification des espèces bactériennes se développant sur le milieu BHI -----	187
4.5.3. Evolution des flores microbiennes au cours de l'affinage-----	187
4.5.4. Concentrations en acides organiques et sucres à la surface des fromages--	193
4.5.5. Corrélations entre les variables-----	195
4.5.6. Potentialités des souches utilisées pour reconstituer des consortiums à produire des acides organiques à partir de différents substrats-----	195
5. Synthèse sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> sur des croûtes de fromages ensemencés avec TR15 ou <i>Penicillium commune</i>-----	201
5.1. Croissance de <i>L. monocytogenes</i> et pH-----	201
5.2. Variabilité des propriétés anti-listeria et dynamique des flores microbiennes----	203
5.3. Variabilité de production des acides organiques et sucres-----	207
Conclusions et Perspectives-----	209
Références bibliographiques-----	225

Annexes

Liste des abréviations

<i>A.</i>	<i>Arthrobacter</i>
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
<i>B.</i>	<i>Brevibacterium</i>
BHI	Brain Heart Infusion
<i>Br.</i>	<i>Brochothrix</i>
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
Caps	Cold acclimation proteins
<i>Cb.</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Cor.</i>	<i>Corynebacterium</i>
Csps	Cold shock proteins
<i>D.</i>	<i>Debaryomyces</i>
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DO	Déclaration Obligatoire
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EFSA	European Food Safety Authority
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point = Analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
LPS	Lactoperoxydase system
<i>M.</i>	<i>Microbacterium</i>
<i>Marini.</i>	<i>Marinilactibacillus</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Pen.</i>	<i>Penicillium</i>
PDO	Protected Designation of Origin
<i>Prot.</i>	<i>Proteus</i>
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RISA	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP	Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism
UFC	Unité Formant Colonie

Introduction

Les filières fromagères représentent un secteur important de l'industrie agroalimentaire française et européenne. En 2008, 1,85 million de tonnes de fromages ont été produits pour un chiffre d'affaires de plus de 7 milliards d'euros (l'Economie Laitière en Chiffres, CNIEL, 2009). Les fromages au lait cru avec 14% de la production française et 8% de la production européenne (700 000 t) sont des fleurons de la gastronomie européenne. Leurs productions participent au développement des zones rurales et au maintien de l'élevage dans des zones de Montagne. Souvent produits sous signe de qualité, elles ont une forte valeur ajoutée.

En absence de traitement thermique ou physique de la matière première lait, les fromages au lait cru ont un lien étroit avec le terroir sur lequel ils sont produits. La diversité microbienne aux niveaux genres, espèces, souches des laits est ainsi préservée. Elle évoluera tout au long du process fromager dès la fabrication et tout au long de l'affinage. La dynamique des populations microbiennes résulte des interactions des microorganismes entre eux et avec leur environnement. Elle contribue à l'acidification des fromages puis, par transformation des composés du lait et la production de métabolites, à l'élaboration des différentes dimensions de la qualité des fromages : qualité sanitaire, caractéristiques sensorielles. Réussir à contrôler les bactéries pathogènes dans les laits et fromages tout en préservant la biodiversité microbienne d'intérêt technologique est un enjeu majeur puisque la législation européenne (règlement CE n° 2073/2005) impose des critères microbiologiques stricts. Notamment, *L. monocytogenes* doit être absente dans 25 g pour les produits permettant sa croissance et son développement ou <100 UFC/g pour les produits ne permettant pas sa croissance. Les risques de toxico-infections liées à la consommation de fromages au lait cru existent mais restent assez faibles. Ils sont minimisés par les mesures d'hygiène, les contrôles rigoureux et l'application de procédures adaptées telles que l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point = Analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise). De plus, comme tout produit fermenté, leur qualité sanitaire bénéficie des technologies de barrière associées aux caractéristiques des procédés de fabrication et aux caractéristiques intrinsèques des fromages fortement associées à la vie microbienne. En effet, l'activité des microorganismes lors des procédés de fabrication est à l'origine d'une succession de barrières potentielles telles que les bas pH, la production de métabolites inhibiteurs (acides organiques, éthanol...), peptides et la compétition nutritionnelle. Ces barrières biologiques semblent d'autant plus efficaces pour inhiber la croissance de pathogènes telle que *Listeria monocytogenes* lorsqu'elles sont combinées aux facteurs environnementaux (a_w , concentrations en sels, température).

Les thématiques de l'Unité de Recherches Fromagères sont centrées sur l'écologie microbienne des fromages au lait cru pour garantir leur qualité sanitaire et préserver leurs caractéristiques sensorielles. Le sujet de cette thèse s'insère dans ce contexte et s'intègre dans un programme européen TRUEFOOD (Traditionnal United Food Europe) qui vise à introduire des améliorations et des innovations dans les filières traditionnelles agricoles. Il s'inscrit dans une partie de ce programme visant l'innovation pour garantir la sécurité sanitaire des produits traditionnels. La stratégie d'innovation est basée sur la gestion et l'exploitation de la biodiversité microbienne des fromages issus des filières traditionnelles afin de maîtriser le développement des pathogènes. L'unité de Recherches Fromagères entre autre étudie la capacité des communautés microbiennes de lait ou de croûtes à inhiber *L. monocytogenes* à cœur ou en surface de fromages Saint-Nectaire.

Cette thèse s'est focalisée sur l'étude des communautés microbiennes de croûte de fromage avec pour objectifs, i) de repérer des communautés microbiennes complexes de fromages (fromages AOC St Nectaire) aux propriétés anti-listeria, ii) d'identifier les populations microbiennes de ces consortiums inhibiteurs, iii) de reconstituer des communautés de composition plus simplifiée aussi inhibitrices que les consortiums complexes afin de pouvoir aborder la nature de l'inhibition.

Le manuscrit s'organise en quatre parties. Après avoir précisé la problématique sanitaire associée à *L. monocytogenes*, la revue bibliographique traite de l'effet barrière des fromages au lait cru en décrivant plus particulièrement les populations microbiennes des fromages et en précisant leurs capacités inhibitrices vis-à-vis de *L. monocytogenes*.

La seconde partie présente le Matériels et Méthodes regroupant les stratégies employées pour le criblage des propriétés anti-listeria des consortiums, la sélection et l'identification des microorganismes et la reconstitution de communautés. Les méthodes d'analyses microbiologique, biochimique et moléculaire des communautés microbiennes de surface des fromages sont également décrites.

La troisième partie relate les résultats. Elle est divisée en 3 sous parties. La première sous partie traite des propriétés anti-listeria des communautés de surface des fromages AOC St Nectaire récoltés sur le terrain. La seconde sous partie vise à étudier et caractériser un consortium complexe inhibiteur issu de l'étape de criblage. La dernière sous partie compare

les propriétés inhibitrices de communautés complexes et de communautés reconstituées dans le but d'aborder la nature de l'inhibition.

Enfin le manuscrit se termine par une conclusion et discussion avant d'évoquer quelques perspectives.

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Nombre de cas	269	263	188	220	209	236	221	290	319	276
Incidence (par million d'habitants)	4,5	4,4	3,1	3,6	3,4	3,8	3,6	4,6	5	4,3
Létalité	23%	17%	32%	21%	16%	20%	17%	22%	22%	16%

Tableau 1 : Nombre de cas déclarés de listérioses par an, taux d'incidence et de mortalité en France

Etude Bibliographique

1. *Listeria monocytogenes*

1.1. Généralités sur *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes a été décrite pour la première fois en 1926 par Murray *et al*, sous le nom de « *Bacterium monocytogenes* » lors de l'observation d'une septicémie chez des lapins de laboratoire.

L. monocytogenes se présente sous la forme de bacilles à Gram-positif, intracellulaires facultatifs, non acido-résistants, non capsulés, catalase positive, asporulés, aéro-anaérobie facultatifs, mobiles et capables de croître sur gélose au sang de mouton en produisant une hémolysine β . Elle est peu exigeante et capable de croître dans des conditions dites défavorables. Elle est ubiquitaire, très répandue dans l'environnement et peut survivre de longs mois dans les sols, le lait, les fèces, la paille... Elle peut être isolée de diverses niches écologiques et de nombreuses espèces animales peuvent également en être porteuses au niveau de l'intestin (10 à 30 % des ovins, caprins...) (Farber et Peterkin, 1991) ainsi que l'homme (environ 5% des adultes sains).

1.2. Pouvoir pathogène

1.2.1. Listériose

L. monocytogenes est l'agent étiologique de la listériose, infection d'origine alimentaire rare mais associée à une mortalité élevée d'environ 20 à 30 % pour les formes les plus graves. La listériose humaine évolue essentiellement sous forme de cas sporadiques et plus rarement sous forme de cas groupés causés par l'ingestion d'aliments contaminés. Toutes les catégories d'aliments (lait et produits laitiers, viande crue et produits carnés, produits végétaux ou produits de la mer) peuvent être contaminés par *L. monocytogenes*. La listériose humaine se manifeste par des septicémies et des méningites chez les individus immunodéprimés et une infection materno-fœtale grave chez la femme enceinte et dans certains cas par des gastro-entérites fébriles (Farber et Peterkin, 1991; Berche *et al*, 2000).

En France, la listériose est une maladie à Déclaration Obligatoire (DO) conformément à l'article L.12 du Code de la Santé Publique (Décret n°98-69 du 13 mars 1998). Entre 1999 et 2005, l'incidence de la listériose humaine en Europe avait nettement diminué pour atteindre en moyenne 4,7 cas/ million d'habitants (1,9 à 7,5 cas /million ; 3,6 cas /million d'habitants en France en 2005 (cf. tableau 1).

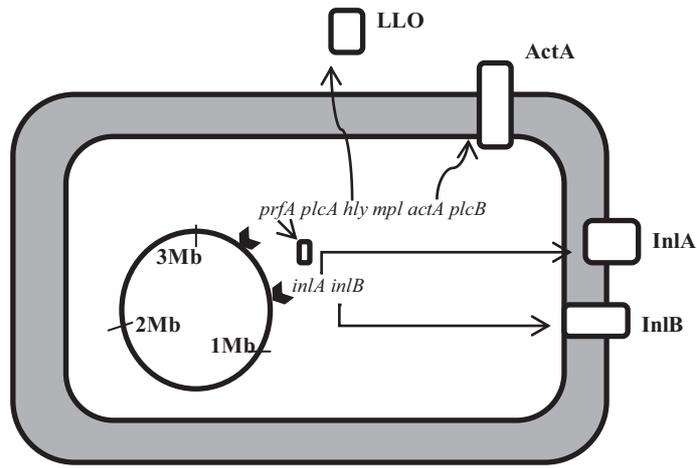


Figure 1 : Position sur le chromosome de *Listeria monocytogenes* des cinq gènes de virulence et localisation de leurs produits (D'après Dussurget *et al*, 2004)
prfA = régulateur transcriptionnel, LLO = Listériolysine O, Inl = Internaline

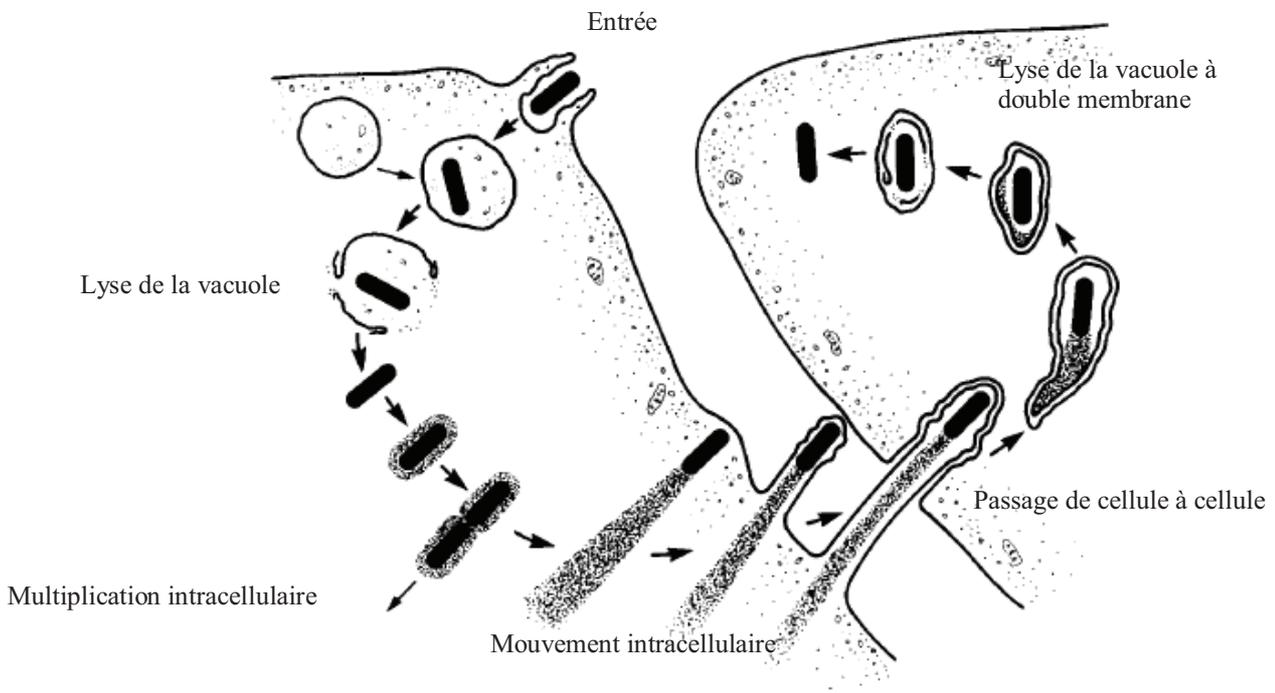


Figure 2 : Etapes de l'invasion cellulaire par *Listeria monocytogenes* (d'après Tilney and Portnoy, 1989)

En 2006, 1583 cas de listérioses en Europe ont été recensés correspondant à une incidence moyenne de 6,3 cas /million d'habitants (3,5 à 10,3 cas / million d'habitants) (EFSA, 2007). Depuis 2006, le nombre de cas de listériose a augmenté chez des sujets dont les défenses immunitaires étaient affaiblies, sous traitements immunosuppresseurs ou âgés de plus de 60 ans (Goulet *et al*, 2008). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette augmentation : 1) l'augmentation de la consommation de produits crus, 2) la présence de nouveaux vecteurs de la contamination, 3) l'allongement des dates limites de consommation, 4) l'utilisation de nouveaux traitements médicaux favorisant les immunodépressions (Goulet *et al*, 2008 ; Gillespie *et al*, 2009).

Lors des foyers émergents de listériose différents types de fromages ont été impliqués : des fromages à pâte molle et croûte lavée tel le Vacherin Mont d'Or en Suisse (1983-1987), des bleus au Danemark en 1990, des fromages Epoisses en France en 1999, des fromages au lait cru en Suède en 2001 et au Canada en 2002, des fromages frais ou à pâte molle de type mexicain aux USA en 2000 et 2003 (McDonald *et al*, 2005 ; Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007).

1.2.2. Virulence de *Listeria monocytogenes*

1.2.2.1. Facteurs de virulence

Au cours du processus infectieux, *L. monocytogenes* a la capacité de franchir 3 barrières : intestinale, hématoencéphalique et foetoplacentaire. De nombreuses études ont permis de caractériser les bases moléculaires des infections cellulaires (cf. revue Dussurget *et al*, 2004). La bactérie est capable de pénétrer dans de nombreuses cellules et notamment celles du système immunitaire qu'elles soient phagocytaires ou non. Les différentes étapes de l'infection cellulaire sont déterminées par l'interaction entre les protéines bactériennes et les facteurs cellulaires. En particulier, cinq protéines codées par *L. monocytogenes* ont un rôle clé durant le processus infectieux : la listériolysine O (LLO), l'internaline A, l'internaline B, l'ActA et le régulateur transcriptionnel PrfA (Figure 1). Les différentes étapes de l'infection sont récapitulées dans la figure 2. Tout d'abord, l'internalisation de la bactérie dans les différents types cellulaires est induite via l'interaction entre les internalines (A et B), la protéine de surface FbpA (protéines membranaires de la bactérie favorisant l'adhérence cellulaire) et la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Cette phagocytose induite passe par la réorganisation du cytosquelette d'actine sous la membrane plasmique au contact de la bactérie.

Après son internalisation, la bactérie lyse la vacuole de phagocytose grâce à l'expression de la toxine LLO codée par le gène *hly* et de phospholipases C permettant ainsi à la bactérie de s'échapper dans le cytoplasme des cellules. La bactérie libre dans le cytoplasme de la cellule se multiplie et se déplace dans le cytosol par un mode de propulsion original utilisant la polymérisation de l'actine cellulaire. La protéine ActA et l'hydrolase p60 agissent en synergie pour assurer le déplacement de la bactérie dans la cellule via la polymérisation de l'actine. La propagation de l'infection aux cellules adjacentes se fait ensuite par la formation de protusions cytoplasmiques. Les gènes codant pour ces protéines sont régulés positivement par la protéine PrfA (régulateur transcriptionnel) (cf. revue Dussurget *et al*, 2004 ; Cossart et Toledo-Arana, 2008).

1.2.2.2. Virulence des souches et sérotypes associés aux listérioses

Les séquençages des génomes de *L. monocytogenes* et *L. innocua* ont ouvert la voie vers une meilleure connaissance des déterminants génétiques de la virulence. Ils ont confirmé la présence d'un îlot de pathogénicité de 10 kb codant pour les principaux gènes de virulence chez *L. monocytogenes* et son absence chez *L. innocua*. De nombreux autres gènes codant pour des protéines LPXTG, des protéines de type lipases ou chitinases, ou encore des protéines impliquées dans le transport des carbohydrates sont spécifiques de *L. monocytogenes* (Glaser *et al*, 2001). Les souches de *L. monocytogenes* peuvent avoir des degrés de virulence variables. Elles se classent en 13 sérovars (Seeliger et Höhne 1979) : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7 selon les caractéristiques de leurs antigènes somatiques flagellaires. Les sérovars 1/2a, 1/2b et 4b constituent 95% des sérovars associés aux listérioses humaines.

Le criblage des sérovars de 1098 isolats de *L. monocytogenes* issus de laits de vaches et de produits laitiers confirme la prévalence des sérovars 4b, 1/2b et 1/2a (Aurora *et al*, 2009). Cependant, au sein d'un même sérovar, il peut exister une hétérogénéité en termes de pathogénicité. Ainsi, Tabouret *et al* (1991) rapportent que 21% des isolats de *L. monocytogenes* issus de produits laitiers ou d'autres aliments sont non pathogènes chez des souris immunodéprimées (inoculées avec 10^4 UFC/ souris). Parmi ces isolats non pathogènes, 40% ont un sérovar 1/2a. Certaines de ces souches présentent une déficience de l'expression de la listeriolysine O, facteur de virulence impliqué lors de l'invasion cellulaire. De même Roche *et al* (2005) ont caractérisé et classé 26 isolats de *L. monocytogenes* de faible virulence suivant leur capacité d'adhésion aux cellules, leur pouvoir invasif et leur activité enzymatique (phospholipases). L'absence de virulence dans ces cas est associée à la présence de mutations

Classification des fromages selon le danger représenté par <i>Listeria monocytogenes</i>	Critères microbiologiques applicables*	Normes de détection et dénombrement	Stade d'application du critère
Fromage ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i>	ayant un pH<4,4 ou aw <0,92 ; pH<5 et aw<0,94 Fromage ayant subi un test de vieillissement favorable ou un test de croissance de phase II**	m ≤ 100 UFC/g (n=5, c=0)	
Fromage permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i>	Fromage n'ayant subi ni test de vieillissement, ni test de croissance de phase II ■ ou ayant subi un test de vieillissement défavorable Aliment ayant subi un test de vieillissement favorable ou un test de croissance de phase II	Absence dans 25 g (n=5, c=0) m ≤ 100 UFC/g (n=5, c=0)	toute la durée de vie du fromage

Tableau 2 : Critères microbiologiques applicables vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* pour un lot de fromages selon la réglementation européenne 2073/2005 amendée par le règlement EC1441/2007e applicable en 2010

* n, m, M et c définis comme suit : n = nombre d'échantillons de 25 g prélevés dans le lot; m = valeur seuil pour le nombre de bactéries en Unité Formant Colonie/g ; M= valeur maximale pour le nombre de bactéries; c=nombre d'échantillons dont la teneur en bactéries peut être comprise entre m et M

** test de croissance de phase II = mesure de l'évolution quantitative d'une population microbienne dans différents échantillons inoculés artificiellement avec une culture connue de microorganismes ; test de vieillissement = étude de l'évolution dans un aliment, de populations de micro-organismes qui y sont habituellement présents, de façon détectable ou non

dans les gènes codant pour les phospholipases ou le régulateur transcriptionnel PrfA. La comparaison génomique de 4 souches de *L. monocytogenes* de sérovars identiques ou différents (2 sérovars 1/2a et 2 sérovars 4b) révèle la présence de 83 gènes spécifiques des sérovars 1/2a et 51 gènes spécifiques des sérovars 4b. Si le gène *prfA* est conservé chez les souches de sérovar 4b, de nombreuses variations génétiques de type Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sont présentes dans les gènes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire et des protéines ancrées dans la paroi. Ces différences pourraient expliquer le pouvoir pathogène plus important des sérovars 4b et les degrés de virulence au sein d'un même sérovar (Nelson *et al*, 2004).

1.3. *L. monocytogenes* dans les produits laitiers

1.3.1. Réglementation

Dans les différents pays industrialisés, des mesures ont été mises en place afin de diminuer le nombre de cas de listériose humaine. Ces mesures ont pour objectifs de réduire la contamination à la production, d'éviter la vente et la consommation de produits contaminés notamment par les personnes les plus à risque et d'organiser un système de surveillance épidémiologique. Ainsi en France, depuis début 2009, les contrôles des denrées alimentaires ont occasionné le rappel de fromages contaminés par *L. monocytogenes* à différents niveaux : Epoisses (11 000 UFC/g), Fourme d'Ambert (<100 UFC/g), Camembert au lait pasteurisé (<10 UFC/g) ou au lait cru (460 à 7200 UFC/g) (source du RASFF¹).

Ainsi, la réglementation européenne (Règlement EC 2073/2005 amendé par règlement EC 1441/2007) impose des critères microbiologiques pour assurer la maîtrise du risque *L. monocytogenes* (Tableau 2).

1.3.2. Contamination des laits

Les fréquences de contamination par *L. monocytogenes* des laits crus individuels ou de mélanges varient entre 1,9% et 19% suivant les études et les pays (Berche *et al*, 2000 ; Gaya *et al*, 1996 ; Kongo *et al*, 2006 ; Vilar *et al*, 2007 ; Van Kessel *et al*, 2004 ; Hamdi *et al*, 2007 ; Latorre *et al*, 2009). Cette variabilité peut être due à des variations de méthodes d'échantillonnage, de sites de prélèvement ou de méthodes d'analyse. La contamination des laits crus est souvent reliée à la présence de la bactérie soit dans les fèces des animaux, soit dans les ensilages de mauvaise qualité, soit dans les lactoducs (Vilar *et al*, 2007).

¹ RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed – Système d'Alerte Rapide pour Denrées Alimentaires et Aliments pour animaux – <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>

De même, la stabulation des chèvres et l'ingestion de grande quantité de matières en décomposition durant l'hiver augmenteraient le risque de contamination des laits crus (Gaya *et al*, 1996).

La présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement d'une ferme peut aussi être associée à la formation de biofilms sur la machine à traire (Latorre *et al*, 2009). L'hygiène des locaux, du matériel, du personnel, de la traite, mais aussi la surveillance sanitaire des animaux et une alimentation de qualité sont des points critiques à maîtriser.

1.3.3. *L. monocytogenes* dans les fromages

1.3.3.1. Contamination des fromages

Les niveaux de *L. monocytogenes* dans les fromages résultent d'une contamination du lait, de l'environnement lors de différentes étapes de fabrication ou durant l'affinage par des contaminations croisées à la surface des fromages (Meyer-Broseta *et al*, 2003 ; Kells et Gilmour, 2004). Quelles que soient les technologies, la synérèse du caillé entraîne une augmentation d'un facteur 10 du niveau de population de *L. monocytogenes*.

Il est difficile de disposer de données officielles sur la fréquence des fromages contaminés par *L. monocytogenes* dans les divers pays, aussi seules celles publiées dans la littérature permettent de l'évaluer. Ainsi, 6,4% des fromages à croûte lavée et 4,8% des fromages Tulum (pâte semi dure) sont contaminés par *L. monocytogenes* (Rudolph et Scherer, 2001 ; Colak *et al*, 2007). Les fromages Sao Jorge (au lait cru) et Minas frescal (fromage frais au lait pasteurisé) ne seraient pas contaminés par ce pathogène (Kongo *et al*, 2006 ; Brito *et al*, 2008).

Sur la base des données publiées dans la littérature entre 1988 et 1999, le pourcentage de contamination en *L. monocytogenes* des fromages bleus italiens varient de 3,4% à 14% (Cantoni *et al*, 1988, 1990; Pinto et Reali, 1996; Bottarelli *et al*, 1999). D'après Ryser (1999), la prévalence de *L. monocytogenes* dans les fromages italiens oscille entre 5 et 9% avec 7% dans le gorgonzola, 6% dans la mozzarella et 4% dans des fromages à pâte molle. En 2005, le pourcentage de fromages Gorgonzola contaminés par *L. monocytogenes* est de 2,1% après l'emballage et atteint 4,8% pour des fromages à la date limite d'utilisation optimale (Manfreda *et al*, 2005).

En France, la mise en place des mesures de contrôle a permis une diminution significative de la fréquence des produits laitiers contaminés. Seuls 5 % des produits sont contaminés par *L. monocytogenes* à la distribution entre 1993 et 1996, dont 8% de fromages au lait cru et 3% de fromages au lait pasteurisé (Berche *et al*, 2000).

Au Royaume-Uni, les niveaux de contaminations en *Listeria spp.* sont de l'ordre de 3,1% de fromages au lait cru ou thermisé avec des niveaux faibles (< 220 UFC/g) et 2,5% des fromages au lait pasteurisé avec des niveaux < 20 UFC/g (Little *et al*, 2008).

La croissance de *L. monocytogenes* à coeur ou en surface des fromages dépend des souches inoculées, de leur état physiologique (souche contaminant naturellement le fromage ou ensemencée après adaptation ou non de l'inoculum) et de leur niveau initial. Elle varie aussi selon les technologies fromagères en fonction des conditions de fabrication (vitesse d'acidification en lien avec la nature des ferments et la température, le brassage, le chauffage ou non du caillé, le salage ou non dans la masse), des conditions environnementales d'affinage (température, humidité, durée) et de stockage jusqu'à la consommation. Tout au long de l'affinage, la vie microbienne, en consommant les nutriments et en modifiant les caractéristiques physicochimiques (pH, aw) et biochimiques des fromages, est aussi déterminante pour le développement de ce pathogène.

La compréhension du développement de *L. monocytogenes* dans les fromages s'appuie sur des challenge-tests en fromages dans des conditions contrôlées et sur la connaissance de facteurs susceptibles de limiter la croissance de ce pathogène comme nous le développerons dans la partie technologie de barrière.

1.3.3.2. Développement de L. monocytogenes lors de challenge tests en fromages

La synthèse du tableau 3 illustre la diversité des conditions environnementales rencontrées lors des fabrications fromagères et pouvant faire barrière à *L. monocytogenes*.

Lors de la fabrication de fromage frais (les fromages blancs, le Mascarpone, la Ricotta, ...), la population de *L. monocytogenes* ensemencée avec *Lactococcus lactis ssp. Cremoris* (Ex *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, 1999). Dans le fromage blanc katiki, un fromage PDO (Protected Designation of Origin) grec au lait pasteurisé de chèvre et/ou brebis, *L. monocytogenes* est inhibée (réduction de 4 logs) dès le 5^{ème} jour à 20°C malgré un inoculum important de 5 souches à 6 Log UFC/ml (Kagkli *et al*, 2009).

L. monocytogenes (5 souches à 10^3 UFC/cm²) ne se développe pas à la surface d'un fromage à pâte semi cuite (Graviera) emballé sous air ou sous vide mais survit encore à 90 jours (Giannou *et al*, 2009).

La technologie des pâtes pressées cuites n'est pas favorable au développement de *L. monocytogenes* qui peut être inactivée dès le chauffage du lait. Celle-ci n'est d'ailleurs plus 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*, 1992a, b) 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, *L. monocytogenes* survit dans un fromage mexicain, le Chihuahua (Solano-Lopez et Hernandez-Sanchez, 2000). Lors de la fabrication du fromage Grana Padano, le maintien du caillé inoculé avec *L. monocytogenes* (10^4 UFC/mL) à une température de 55°C pendant 1 h après la cuisson élimine *L. monocytogenes* (Ercolini *et al*, 2005).

Dans un fromage à pâte semi dure, le Carra, la bactérie est toujours présente même après 90 jours d'affinage (Durmaz, 2009). De la même manière *L. monocytogenes* n'est jamais totalement inhibée dans le Manchego (Morgan *et al*, 2001 ; Solano-Lopez et Hernandez-Sanchez, 2000).

Dans un fromage turc à pâte semi dure Kashar (Cetinkaya *et al*, 2004), lors d'une contamination du lait inférieure à 6 log UFC/mL, le chauffage du caillé et un affinage d'au moins 4 mois sont nécessaires pour supprimer *L. monocytogenes*.

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

Pendant les premières heures de formation du caillé de type Mozzarella, les populations de *L. monocytogenes* sont 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 la 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 disparition complète. *L. monocytogenes* ne survit pas aux conditions de fabrication de la Mozzarella (Buazzi *et al*, 1992c).

De même, pour une inoculation de 10^3 ou 10^5 UFC/ml, l'étirement du caillé de Mozzarella de bufflonne dans une eau à 95°C entraîne une diminution de *L. monocytogenes* de 2 logs en 48 h lors du maintien des fromages dans l'eau d'étirement du caillé (pH 4) (Villani *et al*, 1996).

Les fromages à pâte molle sont, pour la plupart, 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*, 1987a) et en cours d'affinage sa croissance est plus importante en surface qu'à cœur. Ainsi à 60 jours, son niveau est 100 fois plus élevé en surface que dans la pâte. Ces résultats corroborent ceux de Ramsaran *et al* (1998) montrant que la désacidification de la croûte d'un Camembert en cours d'affinage est 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 (Papageorgiou et Marth, 1989b).

La survie de *L. monocytogenes* dans les fromages dépend donc étroitement à la fois des conditions de fabrication mais également de la souche en présence. Afin de limiter la contamination des fromages et de contrôler la croissance du pathogène, diverses stratégies sont mises en place.

Le contrôle des contaminations passe dans un premier temps par la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène et de sécurité lors des fabrications et l'application d'une démarche de type HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point = Analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise). L'HACCP est avant tout une démarche systématique et organisée, permettant dans un processus de production, de renforcer la prévention et d'identifier les points critiques où une intervention est nécessaire pour réduire les risques à un niveau acceptable. Cette méthode intègre le principe de l'amélioration continue et doit s'adapter à chaque technologie fromagère. Les autres stratégies de contrôles consistent à influencer sur les divers facteurs biotiques et abiotiques pouvant déterminer le comportement de *L. monocytogenes* dans les fromages.

2. Les technologies de barrières

Le concept des technologies de barrière initialement énoncé par Leistner est apparu dans les années 1980. Dans l'objectif de produire des aliments stables, sûrs et sains tout en préservant leurs qualités sensorielles, le concept s'appuie sur le fait que l'application d'une combinaison de plusieurs facteurs permet une meilleure préservation des produits traditionnels et en particulier des aliments fermentés. La technologie de barrière vise à combiner une série de barrières que les microorganismes pathogènes ou indésirables ne pourront pas toutes franchir. Elle n'ambitionne pas de détruire ces microorganismes, mais seulement d'inhiber ou de retarder leur croissance (Leistner et Gorris, 1995 ; Leistner, 2000). La nature et l'intensité des barrières pouvant remplir cette fonction varient en fonction de la

Types de fromages	Paramètres lors de la fabrication			Paramètres lors de l'affinage			Emballage/ Stockage
	T °C	aw	pH du caillé	T °C affinage	pH en surface	NaCl	
Fromages à pâte fraîche	18 à 28 °C	0,98 - 0,995	4,3 - 4,5	-	<4,6	0,5 à 5% (voir 15% pour des fromages conservés dans des saumures)	
Fromages à pâte molle	28-38°C / 30-40°C	0,970 - 0,99	4,5 - 4,8 5,8 - 6,45 à l'égouttage	8 à 12°C	>6,5 à l'affinage	0,5 à 4 %	
Fromages à pâte pressée non cuite	30-40°C	0,94 - 0,97	4,8 - 5,2	10 à 12 °C		0,5 à 2,5 %	4 à 12°C
Fromages à pâte pressée cuite	40 - 55 °C	0,885 - 0,905	5,0 - 5,5	12 à 13°C / caves chaudes 16 à 17°C (ex : Comté) ou 20 à 22°C (ex : Emmental)	>6,5	0,5 à 2,5 % ou saumures saturées	
Fromages à pâte persillée	28-38°C / 30-40°C	0,970 - 0,99	4,5 - 4,8 5,8 - 6,45 à l'égouttage,	3 à 8°C	>6,5 à l'affinage	2 à 5 %	

Tableau 3 : Variations de quelques paramètres de fabrication de différentes technologies fromagères

Sont indiquées en gras les valeurs qui théoriquement peuvent faire barrière à *L. monocytogenes*.

charge initiale en microorganismes indésirables (niveau et nature), de l'aliment considéré (composition biochimique) et pourront être différentes à chaque étape du processus de fabrication. Les barrières potentielles contre les microorganismes pathogènes ou indésirables identifiées dans l'élaboration des fromages peuvent être classées comme suit :

1. **Les facteurs physiques** pourront intervenir dès le traitement du lait (pasteurisation, microfiltration, ionisation, champs pulsés, traitement haute pression), lors de la fabrication (température), durant l'affinage des fromages ou ultérieurement lors de leur emballage sous différents films ou atmosphères (haute pression).
2. **les caractéristiques physico-chimiques et chimiques du produit** telles que l'activité de l'eau (a_w), la teneur en NaCl, en inhibiteurs naturellement présents dans la matière première (système lactoperoxydase, lysozyme...) ainsi que l'application de traitement de surface de certains fromages (natamycine...)
3. **les facteurs liés à la vie microbienne** déterminés par les communautés microbiennes naturellement présentes dans le produit ou volontairement ajoutées (ferments, cultures protectrices). Cette vie se traduit par la production de molécules bactériostatiques pour la plupart (acides organiques, alcool, H_2O_2 , CO_2 , bactériocines, antibiotiques...), la consommation des nutriments, la modification du pH ou du potentiel oxydoréducteur des fromages. L'utilisation de certains phages peut conduire à la mort de la bactérie.

2.1. Facteurs physiques

2.1.1. Température

La pasteurisation du lait pendant 30 s à 72°C est efficace pour détruire *L. monocytogenes* (Lemaire *et al*, 1989) mais ne garantit pas son absence dans les fromages affinés en raison de contamination lors du processus de fabrication, pendant l'affinage ou la conservation. Cependant, certaines études montrent que *L. monocytogenes* survit à une pasteurisation courte. En effet, l'étude de Doyle *et al*, (1987) montre que *L. monocytogenes* est capable de survivre dans des laits issus de vaches contaminées, conservés de 2 à 4 jours à 4°C puis pasteurisés à une température de 71,7 à 73,9 °C pendant 16,4s. Selon les auteurs, cette survie peut être expliquée par la présence de la bactérie dans les leucocytes lui conférant ainsi une protection vis-à-vis de la pasteurisation.

Lors de la fabrication, de l'affinage et du stockage des fromages, la température peut varier dans une gamme allant de 55°C lors du chauffage du caillé dans le cas des pâtes pressées cuites à 4°C lors du stockage. Excepté dans les pâtes pressées cuites (chauffage du caillé à 54°C), cette zone de température ne constitue pas un obstacle à *L. monocytogenes* qui est capable de se développer dans une large gamme de température (2 à 45°C). Sa croissance à basse température rend cette espèce particulièrement difficile à contrôler.

Notamment, face à des températures élevées sublétales (entre 45 et 55 °C) ou de réfrigération (2-7°C), *L. monocytogenes* met en place des mécanismes d'adaptations et de résistances (Gandhi et Chikindas, 2007). En réponse au stress (basses ou hautes températures, acidité, stress oxydatif, carence en nutriment), elle produit le facteur σ^B , régulateur transcriptionnel agissant sur de nombreux gènes, contribuant ainsi à sa survie. En effet, σ^B régule positivement la transcription de plus 140 gènes impliqués dans les réponses aux stress, la virulence, la régulation transcriptionnelle ou encore le métabolisme. *L. monocytogenes* soumise à une température sublétale induit la synthèse des « Heat Shock Proteins » (HSP) impliquées dans la régulation de la division cellulaire, la synthèse de la paroi cellulaire ou la réponse SOS. Ainsi, des chocs de températures à 55°C ou 63°C pendant 30 min ne détruisent pas la bactérie mais induisent une augmentation de sa phase de latence en milieu de culture (Vasseur *et al*, 1999). Cependant, l'effet d'un choc thermique à 48°C pendant 15 min n'induit pas une thermotolérance significativement accrue de *L. monocytogenes* après pasteurisation à 71,7°C pendant 15 s (Bunning *et al*, 1992).

En réponse à un stress à basse température, *L. monocytogenes* est capable de modifier la composition de sa membrane lipidique. Ainsi, à une température inférieure à 7°C, l'augmentation de la proportion d'acides gras C₁₅ au détriment des acides gras C₁₇ et des acides gras insaturés permet à la bactérie de maintenir une fluidité membranaire optimum pour sa croissance (Beales, 2004). Des protéines en réponse au froid : les « cold shock protein » (Csps) et les « cold acclimation proteins » (Caps) impliquées dans la régulation des processus de transcription et de réplication sont également synthétisées. De même, d'autres protéines chaperonnes telles que les protéases GroEL, ClpP et ClpB dégradent des polypeptides endommagés produits lors de la croissance à basse température (Liu *et al*, 2002). L'accumulation de molécules cryoprotectrices (glycine, bétaine et carnitine) stimulerait la croissance lors d'un choc froid (Angelidis et Smith, 2003). Elle serait sous la dépendance du facteur général de réponse au stress sigma (σ^B). En effet, la préincubation de *L. monocytogenes* à différentes températures avant culture à 7°C engendrerait une augmentation de sa résistance au froid. Ainsi, François *et al* (2007) ont montré que *L. monocytogenes*

soumise à des températures de 2°C, 4°C, 7°C, 10°C avant culture à 7°C se développe de façon plus efficace avec des phases de latence raccourcies.

L'effet de la température sur la croissance de *L. monocytogenes* doit également intégrer son effet positif sur le développement des flores antagonistes qui pourront l'inhiber.

2.1.2. Traitements par les hautes pressions

L'application de hautes pressions de 20 à 180 MPa sur un aliment retarde la croissance d'un microorganisme en perturbant la synthèse protéique. A partir de 180 MPa, les hautes pressions peuvent être létales pour le microorganisme par l'altération de la membrane cytoplasmique et la dénaturation des protéines. La sensibilité d'un microorganisme aux hautes pressions va dépendre de la pression appliquée, de la température, de la durée d'exposition et du microorganisme.

En culture pure, le nombre de *L. monocytogenes* diminue proportionnellement à l'augmentation de la pression. En effet, 15 min à 400 MPa suffisent pour détruire la bactérie (Fonberg-Broczek *et al*, 2005). Un traitement par haute pression à 500 MPa pendant 10 min et à 20°C, de lait cru contaminé par 10^2 ou 10^4 UFC/ml de *L. monocytogenes* réduit cette population en dessous du seuil de détection. *L. monocytogenes* n'est pas détectée dans les fromages fabriqués à partir de ces laits. En revanche, la croissance de *L. monocytogenes* augmente de 2 log UFC/g en début de fabrication et se maintient à 10^4 UFC/g pendant l'affinage 14 jours à 13°C lorsque le lait n'est pas traité par les hautes pressions (Linton *et al*, 2008).

Le traitement de fromages de chèvres contaminés avec 10^7 UFC/mL de *L. monocytogenes*, après un affinage de 14 jours, avec une pression de 450 MPa pendant 10 min et à 11°C diminue la charge de la bactérie en dessous du seuil de détection sans altérer les propriétés organoleptiques du fromage (Gallot-Lavallée, 1998).

2.1.3. Champs pulsés

L'application d'un champ pulsé électrique agit sur les microorganismes en créant des dommages structurels dans la membrane cytoplasmique via l'augmentation du potentiel membranaire (accumulation de charges opposées dans l'environnement de la membrane). La production de chlore et de radicaux libres engendrés peut également altérer le microorganisme via la dégradation de son ADN. Le traitement de laits écrémés avec 30, 40 ou 50 kV/cm avec un nombre de pulsations de 10,6, 21,3 et 32 permet une réduction jusqu'à 2,3 log UFC/mL (Calderon-Miranda *et al*, 1999).

2.1.4. Irradiations

Les radiations UV, gamma ou ionisantes agissent sur l'ADN des microorganismes et occasionnent la dénaturation des protéines. Notamment, une radiation à 254 nm provoque la formation de dimères de pyrimidines engendrant une distorsion de l'hélice d'ADN et empêchant de ce fait la réplication de l'ADN. Matak *et al* (2005) ont montré que le traitement de laits de chèvres contaminés avec 10^7 UFC/mL de *L. monocytogenes* par une dose de radiation UV de $15,8 \text{ mJ/cm}^2$ réduit sa charge de 5 log UFC/mL. L'application de doses de radiations gamma ou X de 2,6 kGy sur des camemberts inoculés avec 10^4 UFC/g de *L. monocytogenes* la détruit complètement. Cependant, la même dose appliquée sur des fromages chargés à 10^5 UFC/g n'élimine pas complètement le pathogène puisque certaines cellules sont toujours viables après irradiation et à la fin des 45 jours (Bougle et Stahl, 1994). Dans le cas de fromages Feta fabriqués avec des laits contaminés en *L. monocytogenes*, une dose de 4,7 kGy n'élimine pas totalement la bactérie. Cependant, après 1 mois d'affinage, une réduction de la croissance de *L. monocytogenes* de 3,8 log UFC/g est observée. La même dose d'irradiation appliquée sur des fromages Feta dont la saumure est contaminée par *L. monocytogenes* à 10^3 UFC/mL suffit à éliminer la bactérie. A 4,7 kGy, la couleur des fromages est altérée de façon permanente tandis que l'altération de l'arôme n'est plus perceptible après 30 jours (Konteles *et al*, 2009).

Ces techniques peuvent être efficaces pour contrôler un microorganisme comme *L. monocytogenes* dans les fromages à condition de s'assurer qu'elles n'entraînent pas de détérioration des caractéristiques sensorielles des fromages.

2.2. Facteurs physico-chimiques

2.2.1. Teneur en NaCl

Les concentrations en NaCl dans les fromages varient généralement entre 0,5 et 5% (avec des valeurs de 6 à 15 % pour certains fromages à pâte persillée ou pâte fraîche) et résultent d'un salage en surface, par saumurage et parfois dans la masse (fromage type Cantal). *L. monocytogenes* pouvant se multiplier jusqu'à 20% de NaCl, les concentrations dans les fromages, souvent inférieures à 3% ne peuvent à elles seules limiter son développement. De plus, en réponse à un stress osmotique, de nombreux mécanismes d'adaptation se mettent en place. Notamment, les « Salt Shock Protein » telles que DnaK, GbuA et Ctc impliquées respectivement dans la stabilisation des protéines cellulaires, le transport de solutés osmoprotecteurs et l'amélioration du taux de croissance sont synthétisées (Gandhi et

Chikindas, 2007). La présence de composés osmoprotecteurs comme la glycine bétaine, la proline bétaine ou la carnitine améliore le taux de croissance de *L. monocytogenes*.

2.2.2. L'activité de l'eau (activity of water- aw)

L'activité de l'eau (aw) nécessaire à la croissance de la bactérie est de 0,90 dans des conditions où le glycérol est utilisé pour ajuster ce facteur dans le milieu de culture. Plus généralement, la valeur optimale pour son développement est de 0,97 et la bactérie reste viable mais ne croît pas pour des valeurs d'aw inférieures à 0,92.

Des variations de l'aw de 0,999 à 0,949 par ajout de NaCl dans un milieu de culture n'ont pas d'effet sur la croissance de la bactérie (Boziaris *et al*, 2007).

Dans les fromages l'aw varie entre 0,885 et 0,995. Elle diminue plus ou moins fortement durant l'affinage en fonction des fromages, de leur teneur en NaCl, de l'hygrométrie dans les caves et de la durée d'affinage. L'aw à elle seule ne semble pas suffisante pour assurer le contrôle de la bactérie mais peut contribuer à l'inhibition lorsque combinée avec d'autres facteurs.

2.2.3. Le système lactoperoxydase

Le système lactoperoxydase est un système à 3 composants : la lactoperoxydase, le thiocyanate (SCN^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il est utilisé pour conserver le lait cru en absence de réfrigération (IDF, 1988). La lactoperoxydase est naturellement présente dans les laits et est très stable même à haute température (résistance à la pasteurisation). Sa concentration de l'ordre de 30 mg/L de lait de vache peut varier d'un facteur 10 en fonction du stade de lactation, de l'espèce animale, de l'alimentation (Seifu *et al*, 2005). L'eau oxygénée n'est pas naturellement présente dans le lait mais peut être synthétisée par les bactéries lactiques en quantité suffisante pour activer le système lactoperoxydase. Le niveau des ions thiocyanate de 1 à 10 mg/L varie en fonction des races animales et de leur alimentation et n'est pas toujours en quantité suffisante pour activer le système (Seifu *et al*, 2005). Le système catalyse l'oxydation du thiocyanate par l' H_2O_2 conduisant à la production de divers produits, à savoir l'hypothiocyanate (OSCN^-) et l'acide hypothiocyanique (HOSCN) ayant des propriétés antimicrobiennes (Bjorck, 1978). Le système lactoperoxydase a un effet bactéricide ou bactériostatique sur les bactéries, levures et virus. Les mécanismes moléculaires diffèrent en fonction du type d'électron donneur, du milieu, de la température, du pH.

Objectifs	Méthodes *
Quantification des populations cultivables et Identification	cultures sur milieux plus ou moins sélectifs + identification d'isolats par méthodes phénotypiques et moléculaires
Evaluation globale de la structure de la communauté microbienne / Comparaison et suivi de la dynamique des populations microbiennes	DGGE, TTGE, SSCP, RFLP, T-RFLP, RISA, IRTF, clonage +séquençage d'isolats, Puces à ADN
Identification des populations microbiennes	FISH avec des sondes plus ou moins spécifiques
Quantification des populations microbiennes viables non-cultivables	q-PCR + milieux de cultures spécifiques
Détection et quantification des espèces/souches dominantes et sous-dominantes	Puce à ADN basée sur la détection des ADN ou ARNm (cellules fonctionnelles)
Quantification (relative) et dynamique des populations microbiennes dominantes et sous dominantes	DGGE + RT-PCR
Quantification relative des populations microbiennes au métabolisme actif	Cytométrie en flux
Evaluation de l'état physiologique des cellules, réponse aux stress et survie des populations microbiennes d'intérêt	Analyses des sucres et produits d'accumulation de la fermentation

Tableau 4 : Principales méthodes utilisées en écologie microbienne pour caractériser la diversité et la dynamique des populations microbiennes des fromages

*DGGE = Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, TTGE = Temporal Temperature Gel Electrophoresis, SSCP = Single Strand Conformation Polymorphism, (T-RFLP = (Terminal)-Restriction Fragment Length Polymorphism, FISH = Fluorescence in situ Hybridisation, RISA =Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, FT-IR = Fourier-transform Infrared (Micro)Spectroscopy, RT-PCR = Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, q-PCR = quantitative Polymerase Chain Reaction

Les composés produits lors de la réaction de peroxydation agissent sur différents mécanismes cellulaires. Ils provoquent 1) l'allongement de la phase de latence voire l'arrêt de croissance du microorganisme cible, 2) la réduction de l'assimilation de l'oxygène, du glucose ou de la production de lactate par les microorganismes fermentaires, 3) l'inhibition des enzymes du métabolisme de la glycolyse (l'hexokinase, la glycéraldéhyde-3P-déshydrogénase et la D-lactate déshydrogénase) ou du métabolisme des acides nucléiques et 4) l'inhibition des protéines et la dégradation de la membrane cytoplasmique. Les bactéries à Gram négatif de par la structure de leur paroi sont plus sensibles au système lactoperoxydase que les bactéries à Gram positif.

L'effet bactéricide ou bactériostatique du système lactoperoxydase vis-à-vis de *L. monocytogenes* dépend de la concentration des souches, du milieu, de la température (Gaya *et al*, 1991). Ainsi dans un lait cru de vache, 30 à 50 UFC/ml de *L. monocytogenes* sont complètement inactivées après 24h à 35°C ou 24h à 4°C. A des concentrations de 10⁴ à 10⁷ UFC/ml le système lactoperoxydase n'a aucun effet bactéricide sur *L. monocytogenes* quelle que soit la température (El-Shenawy *et al*, 1990). En lait cru de chèvre à 20°C, la croissance de *L. monocytogenes* est uniquement retardée alors qu'aux températures de réfrigération, elle est réduite. Le système lactoperoxydase peut être activé par les ions SCN (20, 60 ppm) et H₂O₂ (20, 60 ppm), il limite alors la croissance microbienne dans des laits de brebis et de chèvre incubés à 20-30°C pendant 6 h. Dans les fromages, en revanche, il est difficile de corréler l'inhibition de *L. monocytogenes* et l'activité du système LPS (Gay et Amgar, 2005). L'inhibition par le système LPS dans du lait de vache peut être augmentée par un traitement à la nisine (100 à 200 unités) pendant 24h (Zapico *et al*, 1998) ou dans du lait écrémé par un traitement haute pression (Garcia-Graells *et al*, 2003).

2.3. Facteurs liés à la vie microbienne

Afin de cerner comment la vie microbienne peut faire barrière à *L. monocytogenes* dans les fromages, il est important de connaître i) quelles sont les populations microbiennes naturellement présentes ou apportées comme ferments, ii) quelles sont leurs dynamiques au cours de l'affinage, et iii) quelles sont leurs capacités inhibitrices et comment celles-ci s'expriment dans les fromages en fonction des caractéristiques de la matière première et des conditions environnementales.

La diversité des communautés microbiennes et leur dynamique au cours de l'affinage peuvent être abordées d'une part par des méthodes culture dépendante basées sur la culture des microorganismes suivie de leur identification phénotypique et moléculaire et d'autre part par

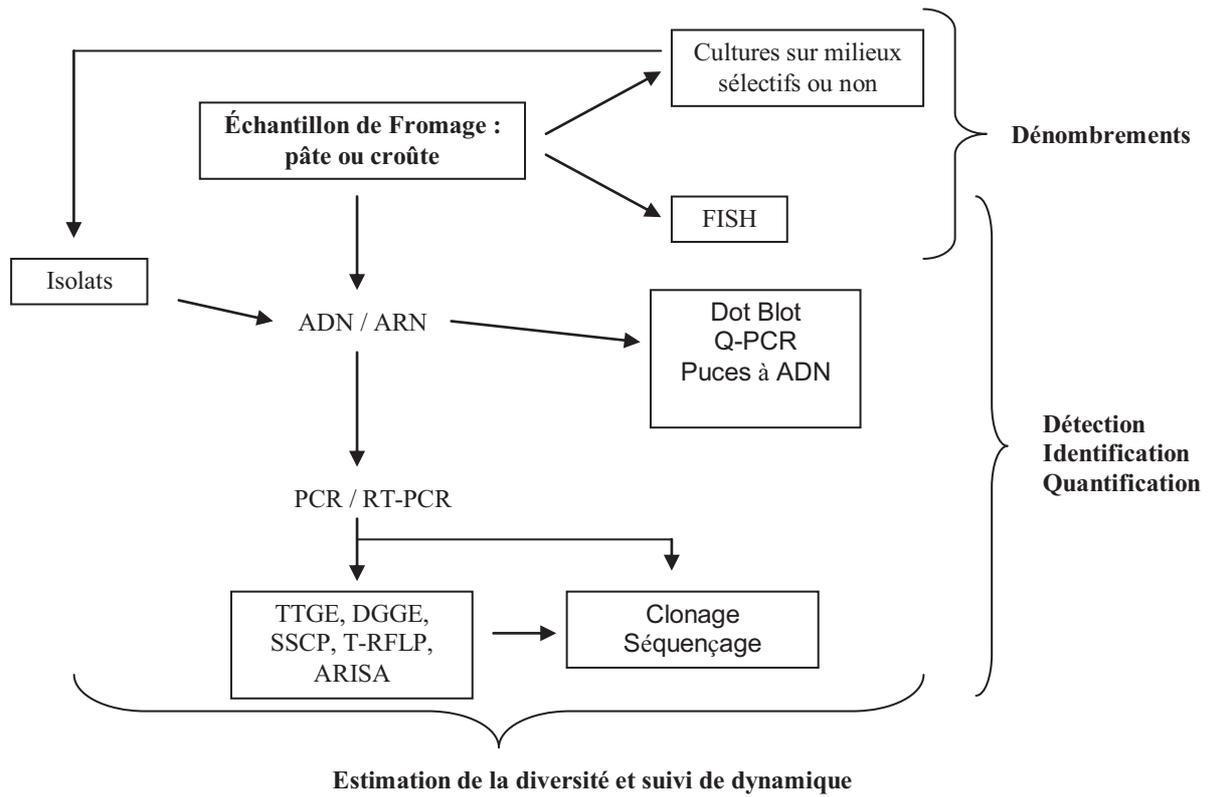


Figure 3 : Méthodes d'évaluation de la diversité microbienne des fromages

des méthodes moléculaires culture indépendante reposant sur l'analyse du pool d'acides nucléiques d'une communauté (cf. Fig. 3 ; tableau 4).

2.3.1. Méthodes d'études dépendantes de la culture des microorganismes

La description et le suivi des communautés microbiennes des fromages par des méthodes cultures dépendantes reposent sur la sélectivité des milieux employés. Leur sélectivité prend en compte les exigences nutritionnelles des microorganismes, leurs besoins en oxygène, leurs susceptibilités aux antibiotiques ainsi que leur croissance en fonction de la température, du pH, de l'oxygène... L'image de la communauté microbienne dépend ainsi de la capacité des microorganismes à se multiplier sur les milieux sélectionnés (Ampe *et al*, 1999). La culture sur milieux très sélectifs permet de détecter des populations microbiennes sous-dominantes mais celles-ci risquent d'être sous estimées par l'emploi d'agents trop sélectifs. Cependant de tels milieux ont le plus souvent été développés pour les microorganismes pathogènes et nécessitent une connaissance du microorganisme ciblé (Giraffa, 2004). La description et la quantification des populations de communautés microbiennes de composition inconnue sur des milieux non sélectifs s'appuient sur la morphologie des colonies, leurs caractéristiques phénotypiques (Gram, catalase, assimilation des composés carbonés...) et génomiques par comparaison de leurs séquences des ADNr 16S ou 26S avec les banques de données ou par application de PCR spécifiques de genres ou d'espèces ciblant certains gènes (Justé *et al*, 2008).

Les méthodes cultures dépendantes sont généralement combinées aux méthodes cultures indépendantes basées sur l'amplification puis l'analyse des acides nucléiques de l'ensemble de la communauté microbienne.

2.3.2. Méthodes moléculaires indépendantes de la culture

Selon les objectifs poursuivis – analyse de la structure et description de la diversité globale d'une communauté, identification ou quantification des populations - les acides nucléiques d'une communauté microbienne peuvent être analysés soit en générant des empreintes moléculaires, soit en déterminant les séquences nucléotidiques de fragments d'ADN, soit en ciblant des populations par amplification de gènes ou hybridation avec des sondes spécifiques.

La plupart des méthodes implique l'amplification par PCR de molécules ADN cibles. Le plus souvent, les régions de l'ADN ciblées appartiennent aux opérons de l'ARN ribosomal microbien rARN 16S, 23S ou 26S ou à des régions intergéniques en raison de leur abondance,

de la présence de régions variables et hautement conservées, de leur fort potentiel discriminant, de la présence de plusieurs copies de gènes et de l'existence de bases de données publiques (GenBank, ribosomal data base) (Justé *et al*, 2008).

La diversité de composition des communautés microbiennes de divers fromages à différents stades de fabrication et d'affinage peut être évaluée et comparée par des méthodes d'empreintes moléculaires telles que la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), la Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), la Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP), la (terminal) Restriction Fragment Length Polymorphism ((T)-RFLP) ou encore la Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA).

2.3.2.1. Méthodes DGGE et TGGE

Elles évaluent la diversité bactérienne notamment par comparaison des profils électrophorétiques de petits fragments d'ADN ribosomal 16S (200-700 pb) amplifiés par PCR. Les fragments d'ADN de tailles similaires sont séparés sur un gel d'acrylamide en condition dénaturante (dénaturant chimique pour DGGE, température pour TGGE) en fonction de leur point de fusion donc de leurs séquences. Les profils sont ensuite comparés entre eux ou à une base de données référençant des espèces connues. Plusieurs régions de l'ADNr 16S bactérien peuvent être analysées ; cependant la région V3 est la plus couramment ciblée en raison de sa longueur et de son hétérogénéité (Florez et Mayo, 2006a, b). Malgré leur relative facilité de mise en œuvre et leur coût raisonnable, l'identification des communautés en termes d'espèces est généralement difficile par ces méthodes dans le cas de communautés très complexes en raison de la co-migration de séquences différentes ainsi que du manque de reproductibilité et de sensibilité vis-à-vis des espèces les moins représentées (Powell *et al*, 2005). Des identifications plus précises nécessitent le séquençage des ADN des bandes du gel de migration. Elles ont été appliquées pour identifier et suivre la dynamique des populations microbiennes dans des laits crus (Lafarge *et al*, 2004a, b) ou dans les fromages : Morbier, Epoisses, Munster, Leerdamer, ... (Ogier *et al*, 2002, 2004), Stilton ou Mozzarella (Ercolini *et al*, 2003a, 2004).

2.3.2.2. Analyse SSCP

Elle est également basée sur la séparation électrophorétique de produits de PCR de longueurs identiques (amplification en général d'une région variable de l'ADNr 16S) en fonction de leur conformation. Après une dénaturation à 95°C, les fragments d'ADN simple brin adoptent une conformation secondaire stable en fonction de leur séquence. Les repliements des fragments

vont déterminer leur vitesse de migration électrophorétique. Lors de la PCR, les fragments d'ADN amplifiés grâce à des amorces nucléotidiques marquées avec un fluorochrome, peuvent être détectés sur les séquenceurs d'acides nucléiques. Si l'amplification par PCR est plus robuste que pour les méthodes précédentes, le risque de formation de plusieurs conformations stables à partir d'une même séquence ou à l'inverse la formation de conformations identiques constituent les principaux désavantages de la technique. De plus, les ADN ne peuvent pas être récupérés pour une identification par séquençage.

L'analyse SSCP a été appliquée à diverses matrices tels que l'eau (Lin *et al*, 2007), les sols (Witzig *et al*, 2006), le fromage Salers (Duthoit *et al*, 2003), le fromage AOC Saint-Nectaire (Delbès *et al*, 2007, Saubusse *et al*, 2007) ou encore le Livarot (Mounier *et al*, 2009).

2.3.2.3. Méthode T-RFLP

Elle combine l'amplification par PCR d'un gène cible à l'aide d'une amorce marquée avec un fluorochrome, la digestion enzymatique et la séparation et détection des fragments à l'aide d'un séquenceur. Seules les régions terminales marquées sont détectées et l'hétérogénéité de leur longueur indique la complexité des communautés. La digestion incomplète ou non spécifique des produits de PCR peut conduire à une surestimation de la diversité microbienne via la détection de fragments de restrictions secondaires lors de l'analyse. Cependant, la bonne reproductibilité de la méthode, la possibilité de détecter des cellules viables non cultivables et la possibilité de combiner l'utilisation de différentes enzymes de restriction afin d'augmenter le pouvoir discriminant constituent les principaux avantages de cette méthode en comparaison avec les méthodes cultures dépendantes.

Cette méthode semi quantitative a révélé la compétition entre les flores *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Microbacterium* et le ferment d'affinage inoculé à la surface des fromages Tilsit (Rademaker *et al*, 2005). L'évolution de l'équilibre *Streptococcus thermophilus* – *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* dans la fermentation du yaourt ou la dynamique de population *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* dans le gouda ont pu être suivies par cette méthode (Sanchez *et al*, 2006).

2.3.2.4. Méthode RISA

Elle repose sur l'amplification de la région intergénique entre les gènes d'ADNr 16S et 23S qui présentent une grande variabilité de longueurs (400 à 1200 pb) et de séquences. Après électrophorèse sur gel, les différentes bandes du profil correspondent à au moins un individu. Comme pour la SSCP, la méthode a été automatisée afin d'améliorer la sensibilité de la

technique en standardisant l'extraction et l'amplification de l'ADN puis la détection par un laser (Fisher et Triplett, 1999). L'amplification préférentielle des courtes séquences associées aux variations de tailles des régions intergéniques au sein d'une même espèce peut conduire à l'apparition de plusieurs signaux pour un seul (micro)organisme (Mateos et Markow, 2005- concerne la drosophile). Cardinale *et al* (2004) ont développé des amorces pour l'amplification de séquences dans des communautés complexes et les ont testées sur des laits de chèvre.

2.3.2.5. *Les puces à ADN*

Les méthodes d'empreintes moléculaires citées ci-dessus permettent l'analyse de nombreux échantillons, mais elles ne donnent généralement qu'une image semi-quantitative de la constitution globale des communautés. Elles sont souvent couplées aux méthodes de clonage et séquençage afin d'identifier les microorganismes composant la communauté en terme d'espèces ou d'OTUs (Operational Taxonomic Units).

Afin d'identifier et quantifier rapidement les populations, la technologie des puces à ADN pouvait apparaître prometteuse vue leur efficacité pour quantifier l'expression de gènes ou détecter des polymorphismes de l'ADN. Des oligonucléotides fixés sur un support vont hybrider ou non avec des ARN ou ADN cibles marqués issus d'une amplification par PCR ou directement extraits d'une communauté complexe. Les ARN ou ADN cibles hybridés sont ensuite détectés grâce au signal émis, ce signal étant proportionnel à l'abondance des ADN cibles hybridés, la méthode devrait pouvoir fournir des informations quantitatives. Cependant, la corrélation du signal à un nombre de cellules initial reste problématique du fait de l'existence possible de plusieurs copies d'une même cible ou d'un même transcrit par cellule au sein d'une communauté (Wagner *et al*, 2007). Malgré ses atouts, la description des communautés microbiennes complexes par la technique de puces à ADN reste très limitée. La seule application concerne la description de communautés microbiennes de salades (Rudi *et al*, 2002). En effet, se posent les problèmes de spécificité d'hybridation des sondes avec leurs cibles et la présence de signaux non spécifiques. De plus, la probabilité qu'une cible soit détectée dépend du nombre de copies et de son abondance par rapport aux autres acides nucléiques marqués du mélange. Ainsi, seules les molécules d'ADN ou d'ARN les plus abondantes (de 0,05 à 5% de plus que les autres) dans un mélange d'acides nucléiques sont quantifiables.

2.3.2.6. PCR quantitative (Q-PCR)

Elle repose sur la possibilité de suivre en continu la quantité d'amplicons produits lors de la réaction de PCR. Cette méthode combine l'amplification d'ADN et la détection des produits d'amplification pendant chaque cycle de PCR. Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon) durant l'élongation. Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin) et la fluorescence émise est mesurée tout au long de la réaction. L'intensité du signal de fluorescence augmente donc de façon proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Les bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus rhamnosus* ont ainsi été quantifiés par Q-PCR dans les produits laitiers fermentés (Furet *et al*, 2004), *Corynebacterium casei* dans les fromages à des concentrations supérieures à 10^5 UFC/g (Monnet *et al*, 2006) ou encore des levures et moisissures contaminantes à 10^3 cellules/mL dans des matrices de type yaourt (Bleve *et al*, 2003). Des étapes d'enrichissement sont souvent nécessaires pour quantifier *L. monocytogenes* (Rudi *et al*, 2005 ; Rantsiou *et al*, 2008) ou *Staphylococcus aureus* par amplification du gène *nuc* (Hein *et al*, 2001, 2005). Comme pour les puces à ADN, la spécificité des amorces, la standardisation de l'extraction des ARN totaux ainsi que le seuil de détection relativement élevé constituent les limites de cette technique. Le challenge des années à venir sera le développement de la PCR quantitative multiplex pour détecter plusieurs cibles en même temps dans un échantillon.

Comme pour les méthodes culture dépendantes, l'interprétation des résultats issus des méthodes moléculaires directes implique d'en connaître les limites. Celles-ci sont inhérentes à la taille et à la représentativité de l'échantillon à analyser et aux conditions de conservation. La performance de l'extraction des acides nucléiques et leur amplification sont également des étapes clés en raison de la présence de composés tels que les sucres, les matières protéiques et lipidiques, les sels présents en quantités variables dans les produits laitiers. L'amplification de séquences dominantes, la variabilité d'efficacité d'amplification selon les amorces, la formation de séquences chimériques, de différences dans le nombre de copies d'un gène sont des facteurs à intégrer dans l'analyse des données générées après amplification par PCR (Justé *et al*, 2008). Les méthodes basées sur l'analyse des ADN d'une communauté sont également critiquées car elles ne distingueraient pas les populations vivantes et mortes (Rudi *et al*, 2005).

2.3.2.7. *Hybridation fluorescente in situ (FISH)*

L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) combine l'hybridation de l'ADN bactérien avec une sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome rendant la détection possible par microscopie à fluorescence ou cytométrie en flux. Elle révèle la morphologie, l'abondance et l'association des microorganismes dans un environnement donné. Elle permet également d'évaluer l'état physiologique des cellules (hybridation des cellules viables par une sonde ciblant des ARN). Avec un seuil de sensibilité de 10^3 cellules, elle est cependant moins sensible que les techniques basées sur l'amplification d'ADN par PCR. La FISH nécessite également une connaissance préalable de l'écosystème pour le dessin de sondes spécifiques.

Le niveau de flore totale à la surface de fromage Gruyère, quantifié par FISH au moyen de la sonde EUB338 était supérieur à celui obtenu par quantification sur milieu. Par contre, le niveau de *Brevibacterium* quantifié par une sonde spécifique était plus faible que celui obtenu sur un milieu sélectif (Kolloffel *et al*, 1999). La diversité des bactéries à Gram positif, à Gram négatif de la classe des gamma-protéobactéries et des levures (*Candida* – *Geotrichum* – *Yarrowia*) du fromage Livarot a été caractérisée par FISH à l'aide de sondes fluorescentes ciblant ces divers microorganismes (Mounier *et al*, 2009). La distribution spatiale de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, et *Leuconostoc mesenteroides* en surface, à cœur et dans les veines de bleu du fromage Stilton a été possible par FISH et l'utilisation de sondes universelles spécifiques (Ercolini *et al*, 2003a, b). Ainsi, les *Lactococcus* ont été détectés uniquement dans la pâte tandis que *Lb. plantarum* et d'autres bactéries coccoides (présumés staphylocoques) étaient localisés en surface et *Ln. mesenteroides* réparti dans la pâte et en surface.

En conclusion, les approches cultures dépendantes et indépendantes, sont souvent complémentaires pour décrire les communautés microbiennes et en obtenir une meilleure image. La description des communautés ne permet pas de comprendre son lien avec les fonctionnalités d'un écosystème. La fonction d'une population dans le fromage est le plus souvent abordée dans un modèle simplifié associant un nombre limité de populations. Les conséquences de ces associations sur la production de métabolites et les qualités des produits peuvent alors être analysées (Deetae *et al*, 2009a, b).

La combinaison des profils génomiques d'une communauté par analyse de l'ARNr 16S avec ceux de profils de gènes fonctionnels permettrait d'aborder la relation structure – fonction. La métagénomique basée sur l'étude exhaustive des génomes et en particulier de l'ensemble des gènes, de leur disposition sur les chromosomes, leur séquence, leur fonction et leur rôle

Tableau 5 : Diversité des bactéries lactiques rencontrées dans les laits et fromages (adapté de Randazzo *et al*, 2009)

Types de fromages	Méthodes d'analyse cultures dépendantes et indépendantes	Espèces identifiées	Références
Laits de chèvre	RFLP, SSCP, séquençage	<i>E. faecalis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lc. lactis lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Str. mitis</i> , <i>E. saccharominimus</i>	Callon <i>et al</i> , 2007
Laits de vache	DGGE, TTGE	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i> ; <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Ln. carnosum</i> , <i>Ln. lactis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Str. uberis</i> , <i>Str. dysgalactiae</i> ,	Lafarge <i>et al</i> , 2004a, b
Fromages à pâte fraîche			
Fior di latte	Cultures, PCR spécifiques, PCR-DGGE	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i>	Coppola <i>et al</i> , 2006
Mozzarella	RAPD, séquençage des ADNr 16S	<i>Aerococcus viridans</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Cb. divergens</i> , <i>Cb. piscicola</i> , <i>Str. bovis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>E. sulphureus</i>	Morea <i>et al</i> , 1999
Feta	Cultures, tests phénotypiques	<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Manolopoulou <i>et al</i> , 2003
Domiaty	PCR-TTGE	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Aerococcus viridans</i> , <i>Lb. versnoldensis</i> , <i>Pediococcus inopinatus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Enterococcus</i>	El-Baradei <i>et al</i> , 2007
Jben	Cultures, tests phénotypiques, rep-PCR	<i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. rhammosus</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> , <i>E. saccharominimus</i>	Ouadghiri <i>et al</i> , 2005
Fromages à pâte molle			
Camembert	RAPD TGGE	<i>Lc. lactis lactis</i> , <i>Lc. lactis cremoris</i> <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. acidophilus</i>	Corroler <i>et al</i> , 1998 Henri-Dubernet <i>et al</i> , 2004, 2008
Torta Arochena	Tests phénotypiques, RAPD	<i>E. faecalis</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. maladoratus</i> , <i>E. avium</i>	Martin-Platero <i>et al</i> , 2009
Brie		<i>croûte</i> : <i>Cb. divergens</i> , <i>Cb. piscicola</i>	Millière <i>et al</i> , 1994
Calenzana	TGGE	<i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. citreum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Casalta <i>et al</i> , 2009
Fromages à pâte semi dure			
Batzos	Cultures, RAPD, tests phénotypiques	<i>Lc. lactis lactis</i> , <i>Lc. lactis cremoris</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>E. durans</i>	Psoni <i>et al</i> , 2003, 2006a, b
Raschera	RAPD, séquençage des ADNr 16S, PCR spécifiques	<i>Lc. lactis lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. lactis cremoris</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. casseliflarius</i> , <i>Vagococcus carniphilus</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Str. infantarius</i>	Dolci <i>et al</i> , 2008a
Pecorino	PCR-DGGE, tests phénotypiques	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>E. faecalis</i>	Randazzo <i>et al</i> , 2006 ; Aquilanti <i>et al</i> , 2007
Manchego	RAPD	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. pentosus</i>	Sanchez <i>et al</i> , 2006

pourrait améliorer les connaissances des écosystèmes microbiens complexes (Cowan *et al*, 2005). Les limites de ces méthodes alliant criblage moléculaire, chimique et biologique sont les mêmes que celles inhérentes aux méthodes cultures indépendantes décrites précédemment en ajoutant la nécessité de développement d'outils performant d'analyses de reconstruction de séquences génomiques et de séquençage à haut débit.

2.3.3. Les communautés microbiennes des fromages et propriétés anti-listeria associées

La composition des communautés microbiennes des fromages a été évaluée soit par méthodes culture dépendante, soit par méthodes culture indépendante, soit en combinant les deux (cf. tableau 4). La diversité des méthodes mises en œuvre rend difficile la comparaison des communautés microbiennes des pâtes et croûtes des différents fromages.

2.3.3.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques peuvent être ajoutées dans le lait sous forme de ferments ou être naturellement présentes. Les principales espèces inventoriées dans les fromages appartiennent aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* ou encore *Vagococcus*, *Carnobacterium* et *Marinilactibacillus*... (cf. tableau 5).

Streptococcus

Aéro-anaérobie facultatifs, les espèces du genre *Streptococcus* se développent aussi bien en présence ou en absence d'oxygène. Elles sont en revanche sensibles aux conditions de culture, notamment de température et pH. Les *Streptococcus* sont mésophiles (ils ont une température optimale de 37 °C) et neutrophiles (pH 7 et milieu acide très mal toléré en particulier).

Cependant il existe des exceptions comme c'est le cas de *Streptococcus thermophilus* qui prolifère à des températures proches de 45 °C, et est couramment inclus dans les levains thermophiles utilisés en fabrication fromagère. Les souches de *Str. thermophilus* sont sélectionnées en fonction de leurs propriétés acidifiantes et aromatiques. Elles sont capables de dégrader le lactose par voie homofermentaire ou hétérofermentaire et de produire des composés aromatiques à partir des acides aminés (Kranenburg *et al*, 2002) et du pyruvate.

Lactococcus

Le genre *Lactococcus* regroupe des bactéries formant des coques souvent disposées en chaînes de longueurs variables et au métabolisme homofermentaire avec production d'acide

Types de fromages	Méthodes d'analyse cultures dépendantes et indépendantes	Espèces identifiées	Références
Fromages à pâte semi dure (suite)			
Sao Jorge	Cultures, typages	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Kongo <i>et al</i> , 2006, 2009
Saint Nectaire	SSCP, séquençage des ADNr 16S	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. saccharominimus</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Ln. citreum</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Aerococcus viridans</i>	Saubusse <i>et al</i> , 2007; Delbès <i>et al</i> , 2007
Salers	rep-PCR, PCR spécifiques, SSCP, séquençage des ADNr 16S	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Str. salivarius</i> , <i>Str. millieri</i> , <i>Str. macedonius</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Callon <i>et al</i> , 2004 ; Duthoit <i>et al</i> , 2003, 2005
Fromages à pâte dure (cuites ou non)			
Alberquilla	RAPD, PCR-TTGE	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>E. faecium</i>	Abriouel <i>et al</i> , 2008
Castelmagno	Cultures, PCR-DGGE	<i>Lc. lactis lactis</i> , <i>Lc. lactis cremoris</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Dolci <i>et al</i> , 2008b
Cueva Magaha	Identification phénotypique	<i>E. faecalis</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. hirae</i>	Martin-Platero <i>et al</i> , 2009
Fontina	PCR-DGGE, séquençage, cultures	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i>	Giannino <i>et al</i> , 2009b ; Dolci <i>et al</i> , 2009
Comté	RAPD, REP-PCR, PFGE, PCR spécifiques	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> ,	Bouton <i>et al</i> , 2002 ; Depouilly <i>et al</i> , 2004 ; Berthier <i>et al</i> , 2001
Parmigiano Reggiano	cultures, PCR-DGGE	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. buchneri</i>	Gala <i>et al</i> , 2008
Fromages à pâte persillée			
Cabrales	PCR-DGGE	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Enterococcus</i> spp.	Florez et Mayo, 2006a, b
Stilton	PCR-DGGE, FISH	<i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Ercolini <i>et al</i> , 2003a
Gorgonzola	DGGE	croûte : <i>Lactococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Carnobacterium</i> sp.	Cocolin <i>et al</i> , 2009

Tableau 5 (suite) : Diversité des bactéries lactiques rencontrées dans les laits et fromages

Lc. = *Lactococcus*, *Lb.* = *Lactobacillus*, *Ln.* = *Leuconostoc*, *E.* = *Enterococcus*, *Str.* = *Streptococcus*, *Cb.* = *Carnobacterium*

lactique L(+). La plupart des espèces se développent à des températures de 10 °C (avec un optimum de croissance à 30°C), en présence de teneurs en sels variables (jusqu'à 6,5% NaCl) et à des pH allant jusqu'à 9,6. Les *Lactococcus* sont présents dans le lait et pourraient essentiellement provenir des fourrages. Dans les ferments mésophiles, les laits crus, les fromages de diverses technologies pâte molle (camembert...), fromage de type bleu (Stilton, Gorgonzola, Cabrales), à pâte pressée non cuite (Salers, Saint-Nectaire, Castelmagno), à pâte pressée semie cuite (Fontina) et autres produits laitiers, les espèces de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* et *Lactococcus lactis ssp. lactis* sont les plus couramment rencontrées et leurs niveaux varient entre 10⁶ et 10⁹ UFC/g de fromages (cf. tableau 5). *Lactococcus raffinolactis* est occasionnellement retrouvé dans les laits crus et fromages (Coppola *et al*, 2006). De même, *Lactococcus garvieae* est isolé dans les laits crus et divers fromages : fromage AOC Salers, fromages égyptiens, fromage Jben et de fromages italiens Mozzarella, Raschera ou encore Fontina (cf. tableau 5).

Durant la phase de fabrication, les lactocoques par catabolisme du lactose et une production importante d'acide lactique contribuent à l'acidification des fromages. Tout au long de l'affinage, les lactocoques vont participer à l'élaboration de la flaveur par production d'alcools, d'aldéhydes (méthylbutanal, méthylpropanal) issus du catabolisme des acides aminés à chaînes ramifiées (leucine, isoleucine, valine), aromatiques (Phénylalanine) ou soufrés (méthionine) (Yvon et Rijnen, 2001 ; Engels et Visser, 1996 ; Morales *et al*, 2003a). Les capacités aromatiques des souches peuvent être accrues par les propriétés autolytiques de certaines souches (Mannu *et al*, 2000).

Bien que la plupart des espèces du genre *Lactococcus* ne présente pas de risques, *Lc. garvieae* peut provoquer des septicémies chez le poisson et a été isolé de mammites bovines et de 6 cas d'infection humaine (cf. revue de Casalta et Montel, 2008).

Enterococcus

Le genre *Enterococcus* rassemble des coques associées en chaînes plus ou moins longues, au métabolisme homofermentaire (production d'acide lactique L (+), se développant dans une large gamme de températures (10 à 45 °C), en présence de 6.5% de NaCl, 40% de bile et à des pH allant jusqu'à 9,6. Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires, colonisateurs des tractus intestinaux des animaux et de l'homme. Ils se retrouvent dans l'environnement via leur excrétion dans les fèces (Giraffa, 2003). Ils sont notamment présents dans les laits crus de chèvres, vaches ou brebis. Parmi les 28 espèces du genre, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* et dans une moindre mesure *Enterococcus hirae* sont les espèces les

plus couramment isolées des laits et fromages (cf. tableau 5). *Enterococcus saccharominimus* et *Enterococcus durans* sont aussi présents dans les laits crus. *E. durans*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus devriesei*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus avium* ou encore *Enterococcus sulphureus* sont aussi occasionnellement rencontrés dans les fromages Mozzarella, dans les pâtes molles Torta Arochena, dans les pâtes semi dures Batzos, Raschera, St Nectaire et dans les pâtes dures Cueva Magaha (cf. tableau 5)

Les entérocoques contribuent au développement de l'arôme des fromages en produisant des composés aromatiques (acides, aldéhydes), de par leurs activités acidifiantes, protéolytiques, estérasiques et de par la production de diacétyl, d'acétaldéhyde, d'acétoïne (non aromatique), de 2,3-butanediol (non aromatique) ou encore de dioxyde de carbone par métabolisme du citrate par certaines souches (Foulquié-Moreno *et al*, 2006). Certaines souches d'*E. faecium* seraient aussi des probiotiques pour l'homme ou l'animal (Foulquié-Moreno *et al*, 2006).

Quoique ingérées depuis des millénaires de par la consommation de fromages au lait cru, l'innocuité de certaines espèces d'entérocoques (*E. faecalis*) fait débat en raison de la présence de certains gènes de virulence (Martin-Platero *et al*, 2009) et de leur implication dans des infections nosocomiales (Foulquié-Moreno *et al*, 2006 ; Ogier et Serror, 2008).

Lactobacillus

Les lactobacilles mésophiles ou thermophiles dominent à cœur des fromages. Ils ont des caractères variables : en forme de bacilles ou coccobacilles, isolés ou en chaînes, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, asporogènes, anaérobies facultatifs, microaérophiles.

Le recensement des espèces de *Lactobacillus* dans le tableau 5 montre que dans les pâtes pressées cuites les espèces de *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbrueckii* (issues des ferments thermophiles) sont les plus courantes tandis que dans les fromages à pâtes pressées non cuites les espèces hétérofermentaires facultatives : *Lactobacillus paracasei* / *casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus curvatus* sont le plus souvent isolées (Beresford *et al*, 2001). Parmi ces 4 espèces, il est à noter que *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus rhamnosus* sont également fréquemment rencontrées dans certains fromages à pâte pressée cuite tel que le Comté (Depouilly *et al*, 2004 ; Berthier *et al*, 2001).

Les lactobacilles sont incapables de réduire les nitrates ou d'hydrolyser la gélatine et possèdent soit un métabolisme homofermentaire avec production quasi exclusive d'acide lactique à partir du glucose soit un métabolisme hétérofermentaire avec production d'acide lactique, d'acide acétique et de dioxyde de carbone. Comme les lactocoques, les lactobacilles

thermophiles participent au processus d'acidification lors de la fabrication du fromage via la production d'acide lactique (Cogan *et al*, 1997). En plus de propriétés acidifiantes, ils jouent un rôle dans la typicité des fromages via la production de composés aromatiques via la dégradation des acides aminés en acides carboxyliques, hydroxy acides, alcools ou aldéhydes (Helinck *et al*, 2004).

Leuconostoc

Les espèces du genre *Leuconostoc* regroupent des coques à Gram positif, au métabolisme hétérofermentaire.

Les espèces *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum* et *Leuconostoc lactis* sont les plus fréquentes dans les fromages Mozzarella, Domiati, JBen, Calenzana ou encore Pecorino (cf. tableau 5). Elles jouent rôle important dans l'ouverture de la pâte pour favoriser l'implantation du *Penicillium roqueforti* dans les fromages bleus (Roquefort par exemple). Elles sont aussi présentes dans les fromages à pâte pressée non cuite (Salers, Saint-Nectaire, Raschera).

Elles produisent de l'acide lactique D(-) à partir des hexoses ainsi que du dioxyde de carbone, de l'éthanol et de l'acide acétique. Certaines souches catabolisent le citrate pour former du diacétyle ; de l'acétate, de l'acétoïne et du 2-3 butanediol et hydrolysent le pyruvate en acide acétique et acide formique grâce à l'enzyme pyruvate formate lyase (Winter, 1974). Elles sont également capables de dégrader l'arginine pour former de l'ammoniac. Elles sont faiblement protéolytiques et lipolytiques et se développent faiblement en lait (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004)

Les leuconstocs sont considérés comme sans risque pour leur utilisation en fabrication fromagère (cf. revue Ogier *et al*, 2008).

Vagococcus

Le genre *Vagococcus* regroupe des coques ou des bactéries ovoïdes ou de formes irrégulières, se présentant de manière isolée ou groupées par deux ou en courte chaîne. Le genre est composé de 6 espèces. Ce genre est proche phylogénétiquement des *Lactococcus* et *Enterococcus*. Il se distingue notamment des *Enterococcus* par son incapacité à cultiver à 45°C ou en présence de 6,5% de NaCl. *Vagococcus sp.* et principalement *Vagococcus carniphilus* sont parfois détectés dans des fromages à pâte semi-dure Raschera (Dolci *et al*, 2008a), ou en surface de fromages à croutes lavées (Mayr *et al*, 2004 ; Maoz *et al*, 2003).

Ces espèces fermentent le glucose principalement en acide lactique. Leur pouvoir pathogène et leur rôle dans les fromages sont inconnus.

Carnobacterium

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou parfois en courtes chaînes. Les neuf espèces du genre *Carnobacterium* se développent à 10°C mais pas à 45°C, et sont incapables de se multiplier à des concentrations de NaCl supérieures à 8%. Leur membrane cytoplasmique est principalement constituée d'acides oléiques (C18 :1, Δ9,10). *Carnobacterium divergens* et *Carnobacterium maltaromaticum* sont les deux espèces les plus fréquentes dans les laits ou les fromages à pâte molle (Millière *et al*, 1994), les fromages Mozzarella (Morea *et al*, 1999) et les Camemberts (Cailliez-Grimal *et al*, 2005). Notamment, *Cb. maltaromaticum* représente une flore importante de divers types de fromages (Briques, Munster, Epoisses...) dans lesquels les niveaux atteints peuvent être supérieurs à 10⁵ UFC.g⁻¹ (Cailliez-Grimal *et al*, 2007). Le genre *Carnobacterium* a également été décrit à la surface des fromages Gorgonzola (Cocolin *et al*, 2009) ou de divers fromages à croûte lavée (Feurer *et al*, 2004). L'espèce *Carnobacterium mobile* a également été isolée des fromages (Ishikawa *et al*, 2007).

Les espèces de *Carnobacterium* sont caractérisées par un métabolisme homofermentaire avec production quasi exclusive d'acide lactique L à partir du glucose. Elles pourraient être considérées comme hétérofermentaire facultatives de par leur capacité à cataboliser le ribose et l'acide gluconique et produire l'acide acétique, de l'acide formique et du CO₂. Elles peuvent également produire de l'acétoïne à partir du pyruvate. Leurs effets sur les qualités sensorielles des fromages ont été peu étudiés. Certaines souches de *Cb. maltaromaticum* et *Cb. divergens* produisent du diacétyl à partir du citrate, mais l'incidence sur à l'arôme du fromage Mozzarella n'a pas été évaluée (Morea *et al*, 1999). De plus, leur capacité à produire des alcools (2-méthylpropanol, 3-méthyl-1-butanol), et des aldéhydes (2-méthyl-1-butanal, 1-butanal, 2-méthylpropanal) à partir des acides aminés branchés leur confère des potentialités aromatiques intéressantes (Leisner *et al*, 2007). Leur innocuité est questionnée car certaines souches peuvent produire des amines (Masson *et al*, 1996).

Marinilactibacillus

L'espèce *Marinilactibacillus psychrotolerans* a été isolée de fromages. Elle est modérément halophile, particulièrement halotolérante (croissance possible en présence de 20% NaCl), alcalophile (croissance optimum à pH 8,5 ou 9) et apte à se développer à des températures de

-1,8°C à 45°C. *Marini. psychrotolerans* peut représenter jusqu'à 40% des isolats des fromages à pâte molle et croûte lavée (Maoz *et al*, 2003 ; Feurer *et al*, 2004) et est détectée dans les fromages St Nectaire (Delbès *et al*, 2007) et divers fromages à pâte molle (Mounier *et al*, 2005 ; Ishikawa *et al*, 2007). Elle est aéro-anaérobie et fermente le glucose en produisant principalement de l'acide lactique L, de l'acide formique, de l'acide acétique et de l'éthanol (Ishikawa *et al*, 2003).

Le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans les fromages est principalement lié à leur capacité à produire des acides organiques, des acides gras ou des molécules inhibitrices de type bactériocines. Le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques est aussi associé à la compétition pour des nutriments.

2.3.3.2. Propriétés anti-listeria des bactéries lactiques

2.3.3.2.1. Les acides organiques et acides gras

Les acides organiques regroupent les acides monocarboxyliques saturés et leurs dérivés insaturés, hydroxyliques, phénoliques et polycarboxyliques. Comme souligné dans le paragraphe 2.3.3.1, selon les espèces, voire les souches, les bactéries lactiques peuvent produire de l'acide lactique (formes D et L), de l'acide acétique, du pyruvate, de l'oxaloacétate, de l'acide formique à partir du lactose, galactose, glucose ou citrate.

Les acides faibles peuvent être soit sous forme dissociée, soit non dissociée en fonction du pKa de l'acide ($pka = pH$ où les formes dissociées et non dissociées sont en équilibre) et du pH de l'environnement. A des pH en dessous de leur pka les acides sont sous forme non dissociée. Sous cette forme, les acides vont pouvoir traverser la membrane cytoplasmique et exercer leur effet inhibiteur par abaissement du pH ou accumulation d'anions (Foster, 1999). Une fois internalisée, la molécule va en effet se dissocier en anions et protons et induire un déséquilibre de l'homéostasie de la cellule pouvant conduire à la mort cellulaire (Cherrington *et al*, 1990). Les acides organiques peuvent également agir sur certaines fonctions du métabolisme associées à la réplication et à la synthèse protéique. Ainsi, dans un bouillon de culture à 37°C, pH 3,7, 100 mM de l'isomère D de l'acide lactique est plus inhibiteur vis-à-vis de *L. monocytogenes* que l'isomère L (Gravesen *et al*, 2004). Dans un bouillon de culture, à pH 4, 37°C et à la concentration de 25 mM l'acide benzoïque est plus inhibiteur de *L. monocytogenes* que l'acide propionique, lui même plus inhibiteur que l'acide acétique et l'acide sorbique, le moins inhibiteur. Cependant, l'inhibition par le sorbate de potassium diminue à pH supérieur à 4, et à 4°C ou 21°C (Cunningham *et al*, 2009).

Dans un fromage blanc produit avec des acides (acides citrique, malique et acétique), l'acide acétique (26,7% d'acide acétique non dissocié) s'avère 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 présente en plus faible concentration lorsque les teneurs en acide lactique produites 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).

Plusieurs modèles prédictifs intègrent les concentrations en acides dans les modèles de croissance de *L. monocytogenes*. Ainsi, Le Marc *et al* (2002) ont décrit un modèle de croissance pour *L. monocytogenes* intégrant les formes indissociées et les quantités globales d'acide lactique, acétique et propionique. Ils 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. Ainsi, la température minimale théorique de croissance de *Listeria* est estimée à -4,5°C et la valeur de pH minimale de 4,21. Les concentrations minimales inhibitrices des acides indissociés sont 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* est inhibée alors qu'à pH 4,54, elle l'est avec seulement 9,8 mM. De même, l'étude de Millet *et al* (2006) confirme la validité de ce modèle en fromage St Nectaire dans lequel *L. monocytogenes* est inhibée à pH 5,2, en présence de 14 mg/g d'acide lactique L et de 0,10 mg/g d'acide acétique. Par conséquent, le pH et les formes dissociées ou non dissociées des acides interviennent dans l'inhibition.

Les acides gras à moyenne chaîne carbonée (C6 à C14) constituent également des molécules inhibitrices vis-à-vis de *L. monocytogenes* et dont l'activité dépend étroitement du pH. Ils sont formés à partir des triglycérides par l'action des lipases, du métabolisme des hydrates de carbone ou de la dégradation des acides aminés. Ils affectent la perméabilité membranaire, le transport de nutriments (Greenway *et al*, 1979) et l'activité enzymatique dans la membrane cellulaire (Voegas et Sa-Correia, 1991).

Dans les laits de vache, chèvres, brebis ou bufflonnes *L. monocytogenes* est particulièrement sensible à l'acide linoléique (C18 :2), l'acide linoléique (C18 :3) et l'acide laurique (C12) (Wang et Johnson, 1992). Les deux acides C18 :2 et C18 :3 ont un effet bactéricide à pH 7 et à des concentrations de 200 µg/mL dans les saumures de stockage des fromages Mozzarella contaminées avec 10⁵ UFC/mL (Petrone *et al*, 1998). De même, 200 µg/mL d'acides gras à C4:0, C6:0 et C14:0 suffisent à prévenir la croissance de *L. monocytogenes* dans les saumures de stockage des fromages alors que les acides C8 :0, C10 :0, C12 :0, C18 :2 et C18 :3 ont un effet bactéricide variable de 30 à 100% (Petrone *et al*, 1998).

La monolaurine inactive *L. monocytogenes* en lait écrémé à 4°C mais elle est moins efficace à 23°C et en lait entier en raison des fortes teneurs en matière grasse. Les autres acides gras testés (acides laurique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique) sont inefficaces dans le lait entier ou écrémé.

Une concentration de 200 µg/cm² de monolaurine inhibe la croissance de *L. monocytogenes* à la surface dans un fromage de type Stracchino (Stecchini *et al*, 1996).

Mécanismes de résistance de *L. monocytogenes* vis-à-vis des acides organiques

Les réponses de *L. monocytogenes* aux acides organiques ne sont pas encore toutes élucidées. Cependant, il est reconnu que *L. monocytogenes* est capable d'induire une réponse adaptative en condition acide. Cette réponse lui confère une plus grande résistance contre des expositions à des pH plus bas. Notamment, la décarboxylation du glutamate catalysée par 2 enzymes GadA et GadB contribuerait au maintien du pH intracellulaire et donc à sa survie. Cette régulation ne semblerait pas intervenir dans l'amélioration de la résistance aux acides faibles en présence de glutamate (Heavin *et al*, 2009). Le facteur σ^B qui contrôle la réponse générale au stress chez *L. monocytogenes* serait également impliqué dans les mécanismes de résistance aux acides mais ne jouerait pas un rôle majeur dans la tolérance aux acides di-acétique et lactique (Garner *et al*, 2006). Les variations de sensibilité de différentes souches de *L. monocytogenes* aux acides organiques et acides gras, peuvent s'expliquer par la mise en place de systèmes de résistances (Gandhi et Chikindas, 2007). Ainsi, Vasseur *et al* (1999) ont observé une tolérance accrue de certaines souches à l'acide acétique tandis qu'elles avaient le même comportement en présence d'acide lactique. L'exposition à des pH 5,5 induit une réponse adaptative permettant à la bactérie de survivre lors d'une exposition ultérieure à des pH plus acides (O'Driscoll *et al*, 1996). Parmi les mécanismes mis en place par la bactérie lors d'un stress acide, la synthèse de la protéine GroEl, d'ATP synthases et de régulateurs transcriptionnels ont été rapportés (Gandhi et Chikindas, 2007). Notamment, la bactérie est

capable de produire des enzymes dédiées à l'excrétion des protons hors de la cellule afin de réguler son homéostasie. Le système glutamate décarboxylase est également actif lors d'un choc acide. Il permet la décarboxylation du glutamate via l'utilisation d'un proton. Enfin, un système de régulation à 2 composants (LisR et LisK) est induit et permet de réguler l'expression des gènes en fonction des changements environnementaux (Gandhi et Chikindas, 2007). La mise en place de ces systèmes de résistance rend *L. monocytogenes* particulièrement difficile à contrôler.

2.3.3.2.2. Diacétyle

Le diacétyle (2,3-butanedione) et ses formes réduites (acétoïne et 2,3-butanediol) peuvent être produits par les lactocoques, les streptocoques, les leuconostocs, les lactobacilles et les pédiocoques via le métabolisme du pyruvate (Molimard et Spinnler, 1996). A des concentrations entre 200 et 1000 ppm, cette molécule aux propriétés aromatiques a aussi une activité antimicrobienne qui serait plus importante à pH 5 que 7. En milieu de laboratoire du diacétyle à 300 ppm ajouté dans l'espace de tête augmente la phase de latence de *L. monocytogenes* et est bactéricide à des concentrations supérieures à 100 ppm (Lanciotti *et al*, 2003). Sa concentration dans les produits laitiers varie entre 44 et 62,5 mg /kg.

2.3.3.2.3. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène peut être produit par les bactéries lactiques (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*) par réactions d'oxydoréduction entre un substrat oxydable et l'oxygène du milieu. La plupart des bactéries lactiques possèdent des NADH oxydase, des pyruvates oxydases et des glycérophosphates – oxydases (Condon, 1987). Une solution d'H₂O₂ à 3% réduit la concentration initiale de *L. monocytogenes* de 6 log UFC/mL dans une culture en 10 min d'exposition à 20°C. L'augmentation de la quantité d'H₂O₂ à 3,5% dans la culture suffit pour obtenir l'élimination complète de la bactérie (Robbins *et al*, 2005). De même, une solution de 5% d'H₂O₂ s'avère efficace pour détruire des biofilms de *L. monocytogenes* en 15 min à 20°C. Le peroxyde d'hydrogène peut intervenir dans l'inhibition par le système LPS (comme décrit au point 2.2.3).

2.3.3.2.4. Production de bactériocines

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique, synthétisées par des bactéries et présentant une activité antibactérienne vis-à-vis de souches différentes de la souche productrice. Les bactériocines sont classées en fonction de leur résistance à la chaleur, de leur

taille, de leurs propriétés physico-chimiques, de leur spectre d'activité et de leur composition en acides aminés (Klaenhammer, 1993). Quatre classes ont ainsi été définies.

La classe I comprend les lantibiotiques. Ces peptides de masse moléculaire inférieure à 5 kDa se caractérisent par la présence d'acides aminés modifiés (lanthionine, P-méthyl-lanthionine).

La classe II est composée de petits peptides dont la masse moléculaire est généralement inférieure à 10 kDa, ne possédant pas d'acides aminés modifiés et stables à la chaleur. Elle est divisée en 3 sous classes. La sous classe IIa se caractérise par une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV. De nombreuses bactériocines appartenant à cette classe ont été décrites (cf. Tableau 6). Elles sont toutes actives contre *L. monocytogenes* mais ont cependant des spectres d'activité très larges (Ennahar *et al*, 1999). Elles induisent une perméabilité de la membrane des bactéries ciblées, entraînant la fuite de composés cellulaires et dissipant la force proton motrice en agissant sur les composants électriques, le potentiel de membrane et ou le gradient de pH. La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

La classe III regroupe les bactériocines de masses moléculaires élevées (supérieure à 30 kDa) et thermosensibles.

La classe IV rassemble les bactériocines dont l'activité nécessite l'association avec des lipides ou des sucres. L'existence de cette classe est controversée.

Le tableau 6 illustre que la majorité des espèces de bactéries lactiques sont capables de synthétiser des bactériocines. L'espèce *Lactococcus lactis* s'avère être une des espèces aux potentialités de production les plus fortes. Le développement de méthodes PCR pour la détection des gènes codant pour ces bactériocines permet de mieux évaluer les potentialités de production des souches pures ou isolées lors des fabrications fromagères (Rodriguez *et al*, 1995, 2000, Giannou *et al*, 2009). Bien que les bactériocines aient de fortes activités bactéricides en milieu de culture, leur activité antimicrobienne dans les matrices alimentaires est souvent plus limitée. Cette perte d'efficacité pourrait être due à une absence de contact entre la bactérie productrice et la bactérie cible, à la dégradation des bactériocines par des protéases, aux conditions environnementales. Le développement de mécanismes de résistance des cellules cibles est également évoqué.

Espèces des souches productrices	Bactériocines	Efficacité de l'inhibition de <i>L. monocytogenes</i> dans les fromages	Référence
<i>Lactococcus lactis</i>	nisine	Ricotta : 2,5 mg/L inhibition pendant 8 semaines	Davies <i>et al.</i> , 1997
<i>Lc. lactis</i>	nisine	Camembert : réduction de 3 log UFC/g pendant la 2ème semaine d'affinage	Maisnier-Patin <i>et al.</i> , 1992
<i>Lc. lactis</i>	lacticine	bactériocine produite dans le lait diminue le nombre de cellules viables en 2 h	Morgan <i>et al.</i> , 2001 ; O'Sullivan <i>et al.</i> , 2006
<i>Lc. lactis</i>	pédiocine PA-1	Cheddar : inhibition de la croissance, niveau <10 UFC/g pendant 3 mois	Buyong <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus plantarum</i>	pédiocine	Munster : diminution de la croissance de en surface	Ennahar <i>et al.</i> , 1996
<i>Lactobacillus plantarum</i>	pédiocine	Fromage à pâte molle : inhibition de la croissance pendant 21 jours	Ennahar <i>et al.</i> , 1998
<i>Enterococcus faecium</i>	pédiocine	Munster : diminution de la croissance de en surface	Ennahar <i>et al.</i> , 1996 ; Izquierdo <i>et al.</i> , 2009
<i>E. faecium</i>	entéroccine	sur l'emballage de fromages frais	Iseppi <i>et al.</i> , 2008
<i>E. faecium</i>	NI	Tallegio : inhibition en surface	Giraffa et Carminati, 1997
<i>E. faecium</i>	enterocine A	fromage de cottage : production hétérologue dans <i>Lc. lactis</i> - réduction de 3 log	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>E. faecium</i>	NI	Dans les fromages frais	Alvarado <i>et al.</i> , 2005
<i>E. faecium</i>	Entéroccines A et B	détection dans les fromages Gravière	Giannou <i>et al.</i> , 2009
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	mésenterocine	Cheddar : inhibition de la croissance	Daba <i>et al.</i> , 1991
<i>Carnobacterium piscicola</i>	piscicoline	action anti-listeria dans les laits entiers et le Camembert	Wan <i>et al.</i> , 1997
<i>Cb. maltaromaticum</i>	CbBM1 et CbB2	propriétés anti-listeria en milieu de culture	Jasniewski <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactococcus, Enterococcus, Lb. plantarum</i>	lactococcine G, plantaricine A, entéroccines, L50A, L50B	détection dans les fromages Gravière	Giannou <i>et al.</i> , 2009

Tableau 6 : Bactéries lactiques productrices de bactériocines inhibitrices de *L. monocytogenes*

- nom de l'espèce non renseigné
NI nom de la bactériocine non renseigné

Les bactéries lactiques issues de laits crus de brebis, chèvres ou vaches produisent de nombreuses et diverses bactériocines (Rodriguez *et al*, 2000). En effet, environ 24 % des isolats de bactéries lactiques testés ont une activité inhibitrice vis-à-vis de bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* principalement via la production de nisine, lacticine et lactococcine A par 3 espèces de *Lactococcus* : *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris* et *Lc. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*. D'autres souches de bactéries lactiques produisent également des bactériocines de classe II ayant des activités anti-listeria : les entérocoques (*E. faecium*), les pédiocines (*Lb. plantarum*), mésentérocoques (*Ln. pseudomesenteroides*) ou encore les piscicolines, carnobactériocines (*Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens*).

De nombreuses souches de *Lc. lactis* sont capables de synthétiser la nisine, une bactériocine de classe I. C'est la seule bactériocine faisant partie des additifs autorisés par l'union européenne. La nisine agit comme la plupart des bactériocines au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules cibles via la formation de pores ou inhibe la synthèse de la paroi cellulaire en s'accrochant aux résidus lipidiques.

Parmi les bactériocines de classe II, une pédiocine PA-1 produite par *Lc. lactis*, des pédiocines produites par *Lb. plantarum* (Ennahar *et al*, 1996) ou *E. faecium* inhibent la croissance de *L. monocytogenes* dans les fromages. De la même façon, une entérocoque appliquée sur l'emballage de fromages frais contaminés est efficace pour contrôler la croissance de *L. monocytogenes* à 4°C (Iseppi *et al*, 2008). D'autres substances de types bactériocines produites par *E. faecium* inhibent *L. monocytogenes* dans des fromages frais (Alvarado *et al*, 2005) et à la surface de fromages Taleggio (Giraffa et Carminati, 1997).

Certaines souches de *Ln. pseudomesenteroides* produisent des mésentérocoques ayant des propriétés anti-listeria dans des fromages Cheddar (Daba *et al*, 1991). Excepté cet exemple, peu de souches du genre *Leuconostoc* isolées de laits crus possèdent des gènes associés à la synthèse de bactériocines (Rodriguez *et al*, 2000).

Enfin, l'effet anti-listeria de la piscicoline est rapporté dans des laits entiers et dans le camembert (Wan *et al*, 1997). Deux autres bactériocines CbBM1 et CbB2 produites par *Cb. maltaromaticum* présentent des propriétés anti-listeria en milieu de culture (Jasniewski *et al*, 2009). Des souches de *Lactococcus* et *Enterococcus* possédant les gènes codant des bactériocines ont été détectés par PCR dans les fromages Graviera (Giannou *et al*, 2009).

Mécanismes de résistances aux bactériocines

Gravesen *et al* (2002) ont montré que la fréquence de résistance de *L. monocytogenes* à la pédiocine PA-1 était d'environ 10^{-6} . Quelles que soient les conditions environnementales et les souches, la fréquence de résistance était souche dépendante et variait en fonction des conditions entre 10^{-7} et 10^{-2} . Le développement de la résistance serait fonction de la température, du pH et des concentrations en sels.

Les souches de *L. monocytogenes* résistantes à la nisine auraient des membranes cytoplasmiques modifiées contenant moins d'acides gras ramifiés, moins de phosphatidylglycérol et cardiolipine que les autres souches. Les acides gras de longues chaînes (C17) seraient augmentés tandis que les acides gras C15 seraient diminués et les souches seraient plus résistantes au lysozyme. La présence de cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) entre la nisine et les phospholipides de la membrane jouerait un rôle dans la résistance. Ainsi, la résistance à la nisine conférerait une résistance croisée à la pédiocine (Crandall et Montville, 1998). De plus, Naghmouchi *et al* (2007) ont montré l'existence de résistances croisées induites par diverses bactériocines de classe I et II. En effet, des souches de *L. monocytogenes* résistantes à une bactériocine : la nisine A, nisine Z, pédiocine PA-1, divergicine M35 ou d'autres composés de type bactériocine auraient une tolérance accrue vis-à-vis des autres bactériocines.

2.3.3.3. Les bactéries corynéformes, microcoques et staphylocoques

Les bactéries corynéformes, microcoques ainsi que les staphylocoques constituent les bactéries dites de surface ou d'affinage des fromages en raison de leur halotolérance et de leur sensibilité aux conditions acides (Irlinger et Mounier, 2009).

Les bactéries corynéformes sont aérobies, acido-sensibles et se développent à des températures de 10 à 12°C. Les genres les plus rencontrés dans les fromages sont : *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Corynebacterium*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Microbacterium*. Suivant les genres et espèces présents dans les fromages une multitude de composés aromatiques vont être produits et participer à la typicité du fromage.

Les niveaux des flores de type corynéformes peuvent être très élevés à la surface des fromages : 10^9 UFC/cm² pour des fromages Fontina ou de 10^{10} à plus de 10^{11} UFC.g⁻¹ pour des fromages à croûte lavée (Dolci *et al*, 2009 ; Feurer *et al*, 2004).

Corynebacterium

Parmi les espèces du genre *Corynebacterium*, *Corynebacterium casei* est fréquemment isolé de nombreux fromages à pâte molle et croûte lavée et à pâte pressée cuite ou non d'origines diverses. Ainsi *Cor. casei* domine à la surface de fromages à pâte molle fabriqués à partir de lait cru (Feurer *et al*, 2004), des fromages Gubbeen (Rea *et al*, 2007) et représente de 24% à 50 % des isolats de croûtes de fromages irlandais ou allemand (Brennan *et al*, 2002 ; Mayr *et al*, 2004). Mounier *et al* (2005) rapportent la présence de *Cor. casei* à la surface de 4 types de fromages irlandais. *Cor. casei* est aussi présent dans la pâte des fromages tels que le St Nectaire (Saubusse *et al*, 2007). Soixante dix à 90% de la flore des fromages Tilsit, 68% de la flore des fromages Chaumes et jusqu'à 80% de la flore de fromages au lait de chèvre est composée par l'espèce *Corynebacterium ammoniogenes* (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001). Les espèces de *Corynebacterium mooreparkense*, *Corynebacterium glutamicum*, et *Corynebacterium variabile* sont respectivement isolées de la surface de fromage irlandais, Fontina et Gubbeen (Brennan *et al*, 2001a ; Brennan *et al*, 2002 ; Dolci *et al*, 2009 ; Rea *et al*, 2007). Dans la pâte des fromages Salers, les espèces *C. variabile*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium afermentans* et *Corynebacterium flavescens* sont également détectées (Duthoit *et al*, 2005). Les Corynebactéries sont rencontrées dans la nature et sont des parasites commensaux du rhino-pharynx. *Corynebacterium diphtheriae* (bacille de Loeffler) cause la diphtérie. Les autres Corynebactéries sont des pathogènes opportunistes assez rares.

Arthrobacter

Le genre *Arthrobacter*, très répandu dans le sol et les environnements (Mulder et Antheunisse, 1963) est aussi présent dans le lait, au cœur des fromages mais surtout à leur surface (Irlinger *et al*, 2005). Les espèces du genre se présentent généralement sous la forme de bacilles irréguliers parfois ramifiés durant la phase exponentielle de croissance et sous la forme de cellules coccoïdes en phase stationnaire. Irlinger *et al*, (2005) ont décrit les espèces *Arthrobacter arilaitensis* et *Arthrobacter bergerei* à la surface de fromages à croûte lavée et ces espèces ont également été isolées à cœur de fromages Saint-nectaire (Delbès *et al*, 2007). *Arthrobacter arilaitensis/nicotianae* est l'espèce d'*Arthrobacter* la plus fréquente à la surface de fromages à croûte lavée (Maoz *et al*, 2003 ; Valdès-Stauber *et al*, 1997) et représente 5 à 10 % des isolats issus de fromages semi-durs Tilsit, 0,2 à 7 % des isolats de fromages au lait de chèvre et 1,5 à 30% des isolats des fromages Chaumes (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001). Les espèces *Arthrobacter ilicis* et *Arthrobacter variabilis* sont présentes dans divers fromages à pâte molle tels que l'Époisse, Pont l'Évêque, « Germain » (Carnio *et al*, 1999), et

le genre *Arthrobacter* en surface des fromages Gorgonzola (Cocolin *et al*, 2009), à cœur des fromages Domaiti (El-Baradei *et al*, 2007), Comté, et en surface des fromages Beaufort (Ogier *et al*, 2002, 2004). Etant donnée leur large distribution dans les sols, les espèces d'*Arthrobacter* sont capables de métaboliser de nombreux substrats via un métabolisme respiratoire. La plupart des espèces sont aérobies strictes.

Brevibacterium

Le genre *Brevibacterium* est certainement un des plus étudiés parmi ceux rencontrés à la surface des fromages du fait de l'utilisation de certaines souches dans certains ferments de surface. Les espèces du genre sont aérobies, chimio-organotrophes, immobiles, asporulées et ne produisent pas ou peu d'acides. Elles tolèrent des concentrations en sels de 8 à 20% et alcalinisent des milieux de cultures jusqu'à des pH de 9,5 en 24 à 36 h. Leur croissance est possible à des températures de 20 à 30°C, voire 37°C suivant les espèces et les souches.

Brevibacterium linens est l'espèce du genre la plus représentée à la surface des fromages à croûte lavée représentant de 10 à 40% de la flore de surface (Valdès-Stauber *et al*, 1997 ; Mayr *et al*, 2004). Cette espèce est également détectée en proportions variables à la surface des fromages St Nectaire, Comté, Beaufort ou Tilsit (Marcellino *et al*, 1992 ; Ogier *et al*, 2004 ; Delbès *et al*, 2007 ; Rademaker *et al*, 2005). Certaines souches de *B. linens* produisent un pigment de type caroténoïde donnant une couleur orangée aux fromages (Motta et Brandelli, 2008). Certaines souches synthétisent de faibles quantités d'acides gras et d'alcools mais dégradent les acides aminés soufrés en : méthanthiol, diméthylsulphide, diméthyltrisulfure ou S-méthylthioester (Deetae *et al*, 2007).

Brevibacterium aurantiacum a été isolé de fromages Gubbeen (Rea *et al*, 2007), *Brevibacterium amoniagenes* de fromages autrichiens (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995) et *Brevibacterium casei* en surface les fromages Fontina ou Gubbeen (Corsetti *et al*, 2001 ; Dolci *et al*, 2009 ; Brennan *et al*, 2002).

Brachybacterium

Le genre rassemble des espèces non acido-résistantes, non sporulées, immobiles et aéro-anaérobies et capables de se développer à des températures comprises entre 15 et 28°C, en absence ou présence de NaCl (10%) et à des pH variant de 6 à 9. Dans les cultures en phase exponentielle, les cellules sont de petits bacilles de forme irrégulière parfois groupés en V. En phase stationnaire, la majorité des bactéries apparaissent sous la forme de cellules coccoïdes groupées ou non en amas.

Les espèces *Brachybacterium nesterenkovii*, *Brachybacterium faecium*, *Brachybacterium alimentarium*, *Brachybacterium tyrofermentans* sont isolées de fromages Salers (Duthoit *et al*, 2003), Livarot (Larpin *et al*, 2004), Gruyère (Schubert *et al*, 1996), Beaufort (Ogier *et al*, 2004), St Nectaire (Delbès *et al*, 2007) et de nombreux fromages à croûte lavée (Rea *et al*, 2007 ; Mayr *et al*, 2004).

En milieu de culture, *Brachybacterium sp.* produit des esters comme l'éthyl ester d'acide hexanoïque, des cétones comme le diacétyl et différentes méthyl cétones impliquées dans l'odeur et l'arôme de nombreux fromages (Deetae *et al*, 2007).

Microbacterium

Les espèces du genre *Microbacterium* forment de petits bacilles non mobiles à coccoïde dans les cultures âgées. Certaines espèces de *Microbacterium* sont capables de survivre à un traitement thermique de 30 min à 63°C. Les espèces de *Microbacterium gubbeenense* et *Microbacterium lacticum* sont les plus fréquemment isolées de la surface de divers fromages à croûte lavée type Gubbeen et de fromages Comté (Rea *et al*, 2007 ; Mayr *et al*, 2004 ; Mounier *et al*, 2005 ; Ogier *et al*, 2004). *Microbacterium foliorum* produit peu de composés soufrés mais de plus fortes teneurs en acides 2-méthyl butyrique et caproïque et en alcools comme le phényléthanol dans un milieu liquide (Jollivet *et al*, 1992 ; Deetae *et al*, 2007). Les espèces du genre *Microbacterium* possèdent généralement un métabolisme respiratoire et produisent des acides à partir du glucose.

Leucobacter

Les espèces du genre se présentent sous la forme de bacilles à Gram positif, asporulés, aérobies et producteurs de catalase. Certaines espèces se développent en présence de 2 à 5 % de NaCl (Takeuchi *et al*, 1996). Peu d'espèces sont décrites dans les laits et fromages. *Leucobacter komagatae* a été isolé de lait cru (Delbès *et al*, 2007), de fromages à croûte lavée (Mayr *et al*, 2004 ; Monnet *et al*, 2010, Larpin *et al*, 2004) et de croûtes de fromages St Nectaire (Châtelard *et al*, 2009). Selon Mounier *et al* (2008) la croissance des *Leucobacter* en surface des fromages serait dépendante de la présence et de l'abondance de certaines espèces de levures.

Micrococcus

Les espèces du genre *Micrococcus* appartiennent à la famille des *Micrococcaceae*. Les cellules sont des coques de 0,5 à 2 µm de diamètre, souvent groupées en paire ou en tétrade,

généralement immobiles, aérobies et à métabolisme oxydatif. Bien que proches phylogénétiquement des espèces du genre *Arthrobacter*, leur morphologie est identique au genre *Staphylococcus*. Plus rarement décrites, les espèces du genre *Micrococcus* peuvent toutefois représenter 1 à 20 % des isolats de surface des fromages à croûte lavée Chaumes (Bockelmann *et al*, 2005). *Micrococcus luteus* et *Micrococcus lacticum* se retrouvent à la surface de fromages Morbier, Comté, Beaufort (Ogier *et al*, 2004). Les microcoques ont une forte activité estérasique et n'ont pas de rôle important dans la protéolyse des fromages (Ortiz De Apocada *et al*, 1993).

Staphylococcus

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae* dans laquelle sont également inclus les genres *Macrococcus*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus* et *Salinicoccus* (Garrity et Holt, 2001). Phylogénétiquement, il est relié à la branche "*Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*" (Stackebrandt *et al*, 1997). Les espèces sont anaérobies facultatives et la plupart sont capables de se développer en présence de 15% de NaCl et à des températures de 18 à 40°C (Beresford et Williams, 2004). Leur métabolisme est respiratoire ou fermentatif et elles sont capables d'utiliser diverses voies métaboliques : glycolyse, voie des hexoses monophosphates ou encore cycle des acides tricarboxyliques. Elles consomment le lactose ou le lactate et en l'absence de sucres dégradent les acides aminés (Mounier *et al*, 2007).

Les staphylocoques à coagulase positive *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius* et *Staphylococcus schleiferi* sont présents dans les fromages de façon occasionnelle. Par contre, *Staphylococcus aureus*, est fréquent à de faibles niveaux dans les fromages au lait cru. De par sa capacité à produire des entérotoxines, *S. aureus* fait l'objet d'une réglementation puisque la directive paquet hygiène 852 853-2004 impose de rechercher les entérotoxines, si son niveau dépasse 10⁵ UFC/g.

Les espèces de *Staphylococcus* à coagulase négative sont présentes en particulier à la surface des fromages. Les staphylocoques peuvent représenter de 0 à 15% des isolats des fromages Tilsit, Chaumes ou fromages de chèvre (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001) et jusqu'à plus de 30% de la flore de surface de fromages à croûte lavée (Mayr *et al*, 2004). Ils se développent surtout en début d'affinage, les bactéries corynéformes devenant ensuite dominantes (Brennan *et al*, 2002).

Staphylococcus equorum est l'espèce la plus fréquente dans divers types de fromages à croûte fleurie ou lavée mais d'autres espèces telles que *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus lentus*,

Staphylococcus sciuri et *Staphylococcus succinus ssp. casei* sont aussi isolées (Irlinger *et al*, 1997; Bockelmann *et al*, 1997; Hoppe-Seyler *et al*, 2004; Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001; Bockelmann, 2002, Delbès *et al*, 2007 ; Rea *et al*, 2007 ; Macedo *et al*, 1995 ; Mayr *et al*, 2004). Des sous espèces de *S. equorum* (Bockelmann, 2002) – *S. equorum ssp. linens* (Place *et al*, 2003) mais aussi *S. succinus subsp. casei* (Place *et al*, 2002) – pourraient être proposées comme ferment pour les fromages à croûtes lavées ou les fromages semi durs suisses. Les laits ou fromages de chèvre contiennent des espèces originales, *S. fleuretti*, (Vernozy-Rozand *et al*, 2000). Des espèces halophiles proches des *Staphylococcus* sont présentes dans le lait cru de vache comme *Jeotgalicoccus psychrophilus* (Delbès *et al*, 2007) et *Salinicoccus sp.*, *Ornithinicoccus sp.*, *Dietzia maris*, *Exiguobacterium sp.* dans les laits de chèvre (Callon *et al*, 2007).

Leurs rôles dans le développement des caractéristiques sensorielles des fromages ne sont pas bien définis. Cependant, la caractérisation de la fraction volatile d'une souche de *S. equorum* de fromage montre sa capacité à produire des aldéhydes et alcools (3-méthyl-3-butane-1-ol) caractéristiques d'odeur de type fruité (Deetae *et al*, 2007). Les espèces du genre *Staphylococcus* à coagulase négative sont largement représentées dans les fromages et ne présentent pas de risque sanitaire majeur (cf. revue Irlinger, 2008).

2.3.3.4. Propriétés anti-listeria des bactéries corynéformes et *Staphylococcus*

Diverses espèces des genres *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* et *Staphylococcus* isolées de fromages présentent des propriétés anti-listeria. Des substances produites par des espèces de *Corynebacterium* sont supposées être des bactériocines mais elles n'ont pas été caractérisées (Carnio *et al*, 1999).

Plusieurs espèces d'*Arthrobacter* : *A. ilicis*, *A. nicotianae* et *A. variabilis* ont la capacité d'inhiber la croissance d'au moins 6 souches différentes de *L. monocytogenes* (Carnio *et al*, 1999). Valdès-Stauber *et al* (1991) ont également isolé deux souches *A. nicotianae* et *A. nucleogenes* aux propriétés inhibitrices. Bien que les substances produites n'aient pas été identifiées et caractérisées, leur nature protéique indique qu'il s'agirait de substances de type bactériocines.

Seize souches de *B. linens* de fromages ont montré des propriétés inhibitrices vis-à-vis d'espèces de *Listeria* par la production de substances de poids moléculaire supérieur à 12 kDa et thermosensibles qui pourraient être des bactériocines (Motta et Brandelli, 2002, 2003, 2008). Une souche de *B. linens* produit une bactériocine, la linocine M18 ayant une activité inhibitrice sur les genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* et *Listeria*

(Valdès-Stauber *et al*, 1994). Sur les fromages, la souche productrice de linocine réduit la croissance de *Listeria ivanoii* et *L. monocytogenes* de 1 à 2 log UFC/g. Une autre bactériocine produite par certaines souches de *B. linens*, la linenscine OC2 présente une activité inhibitrice dans un milieu solide à base de lactosérum (Motta et Brandelli, 2003 ; Motta et Brandelli, 2002). *Microbacterium lacticum* issu de fromages, produit également une linocine, substance de type bactériocine inhibitrice de *L. monocytogenes* (Carnio *et al*, 1999). *Microbacterium lacticum* inoculé sur des fromages Tallegio inhibe la croissance de *L. monocytogenes* via la production d'une bactériocine non caractérisée (Carminati *et al*, 1999).

D'autre part, une souche de *S. equorum* constituant 2,5% de la flore totale de surface de fromage raclette, produit un peptide macrocyclique de nature antibiotique, la micrococcine P1 ayant une activité bactériostatique sur la croissance de 95 souches de *Listeria*. Inoculée en surface des fromages, elle réduit la croissance de *L. monocytogenes* d'1 log UFC/cm² lors d'une contamination de départ de 10² UCF/cm² alors que l'inhibition est totale avec une contamination de 10 UCF/cm² (Carnio *et al*, 2000). Bockelmann *et al* (2006) ont également décrit 2 souches d'*Aerococcus viridans* et 2 souches de *S. equorum* inhibitrices de *L. monocytogenes*.

2.3.3.5. Bactéries à Gram négatif

Les bactéries à Gram négatif sont présentes dans de nombreux fromages au lait cru et peuvent constituer jusqu'à 40% des isolats bactériens de la surface des fromages à croûte lavée (Maoz *et al*, 2003 ; Mounier *et al*, 2005). Des espèces telles que *Pseudomonas spp.*, *Hafnia alvei*, *Serratia spp.*, *Halomonas spp.* et *Psychrobacter spp.* atteignent couramment des niveaux de 10⁶ à 10⁹ UFC.g⁻¹ à la surface de divers fromages Langres, Epoisses, Morbier, Beaufort, Comté (Ogier *et al*, 2004) ou encore St Nectaire (Delbès *et al*, 2007) et autres fromages à croûte lavée (Mayr *et al*, 2004, Rea *et al*, 2007). Les espèces, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp* et autres *Proteus spp.* sont également fréquemment isolées (Delbès *et al*, 2007 ; Ogier *et al*, 2002 ; Bockelmann *et al*, 2005). *Proteus vulgaris* est capable de coloniser la surface d'un modèle fromage et d'inhiber la croissance d'*A. arilaitensis*, *B. aurantiacum* et *Hafnia alvei* par rapport à un témoin sans cette espèce (Deetae *et al*, 2009a). En revanche, la présence de *Prot. vulgaris* n'a pas d'effet sur les levures après 5 jours d'affinage (*Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*).

Les bactéries à Gram négatif peuvent avoir à la fois des effets positifs et négatifs lors de l'affinage des fromages. Ainsi, des espèces de *Pseudomonas* présentes à des niveaux élevés

Tableau 7 : Espèces de levures identifiées dans les laits et fromages (d'après Jacques et Casaregola, 2008)

Espèces dominantes	Espèces plus rarement isolées
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	<i>Pichia</i> sp.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Pichia kluyverii</i> var. <i>kluyverii</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Dipodascus capitatus</i>
<i>Pichia fermentans</i> var. <i>fermentans</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida sphaerica</i>
<i>Rhodotulora</i> spp.	<i>Candida tenuis</i> ,
<i>Trichosporon</i> spp.	<i>Candida versatilis</i>
<i>Candida</i> spp. : <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Candida catenulata</i> , <i>Candida intermedia</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Geotrichum</i> spp, <i>Geotrichum candidum</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Pichia pseudocactophila</i>
	<i>Saccharomyces unisporus</i>
	<i>Saccharomyces exiguus</i>
	<i>Dipodascus capitatus</i>
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	<i>Williopsis californica</i>

dans les laits crus ($>10^6$ UFC/mL) occasionnent des défauts de flaveur par une production élevée de composés volatils tels que des éthyls esters et des alcools, et de texture (augmentation de la viscosité du lait) (Morales *et al*, 2005). D'autres bactéries telles les *Serratia spp.* possèdent des activités lipolytiques et protéolytiques (dégradation de la caséine) qui peuvent également affecter la qualité du fromage (Morales *et al*, 2003b). En revanche, les espèces de *Proteus vulgaris* et *Psychrobacter spp.* produisent divers composés en fortes quantités comme des aldéhydes (ex : 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal, phénylacétaldéhyde) et des alcools, composés entrant dans les caractéristiques olfactives des fromages Camembert, Cheddar, Gruyère ou Mozzarella (Deetae *et al*, 2007).

2.3.3.6. *Levures et moisissures*

Les levures présentes dans l'eau, l'air, le sol et les plantes peuvent se retrouver dans le lait à des niveaux variant entre 1 et 4 log UFC/mL et avec une moyenne à 1,7 log UFC/mL (Torkar et Vengust, 2008). Elles vont se développer en surface des fromages en concentration 100 à 1000 fois plus importantes que dans la pâte (Leclercq-Perlat *et al*, 1999) ; leur niveau atteint 10^8 à 10^9 UFC/g en surface de certains fromages (Lopandic *et al*, 2006). Elles sont capables notamment de se développer dans des conditions de bas pH, d'aw faible, de basses températures et fortes concentrations en sels.

Comme indiqué dans le tableau 7 plus d'une vingtaine d'espèces de levures ont été isolées de laits crus et de fromages (Lopandic *et al*, 2006). Sur les fromages les niveaux moyens se situent entre 10^3 et 10^5 UFC/g et peuvent atteindre jusqu'à 10^9 UFC/g (Lopandic *et al*, 2006). Les espèces dominantes appartiennent essentiellement aux espèces *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans*, *Pichia fermentans* var. *fermentans*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotulora spp.*, *Trichosporon spp.*, *Candida spp.*, *Candida zeylanoides*, *Candida sake*, *Candida catenulata*, *Candida intermedia* et *Geotrichum spp.*, *Geotrichum candidum*, *Torulaspora delbrueckii*. *D. hansenii* est cependant souvent l'espèce dominante en surface de nombreux fromages à croûte lavée ou fleurie tels que Weinkase, Romadur, Limburger, Tilsit, Roquefort, Cabrales, Camembert et St Nectaire (Ogier *et al*, 2004 ; Mounier *et al*, 2005 ; Saubusse *et al*, 2007, Rea *et al*, 2007) et est commercialisé comme ferment d'affinage. De même *G. candidum* est largement présent en surface des fromages (Pottier *et al*, 2008). D'autres espèces, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia spp.*, *Trichosporon cutaneum*, *Pichia kluyverii* var. *kluyverii*, *Pichia jadinii*, *Dipodascus capitatus*, *Candida rugosa*, *Candida sphaerica*, *Candida tenuis*, *Candida versatilis*, *Issatchenkia occidentalis*,

Clavispora lusitaniae, *Pichia pseudocactophila*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces exiguus*, *Williopsis californica* ne sont qu'occasionnellement détectées ou minoritaires (cf. revue de Jacques et Casaregola, 2008).

Les levures jouent un rôle essentiel lors de la désacidification de la pâte via le catabolisme du lactate et des acides aminés (Gori *et al*, 2007 ; Mansour *et al*, 2008). Elles sécrètent 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. Elles produisent une grande variété de composés volatils (composés soufrés, aldéhydes, cétones) et dégradent certains acides aminés à l'origine des arômes des fromages (Molimard et Spinnler, 1996 ; Boutrou et Guéguen, 2005). Notamment, *Kluyveromyces lactis* produit des esters comme l'acétate d'éthyl aux notes fruitées (Arfi *et al*, 2002) et *Geotrichum candidum* des méthylcétones (pentane-2-one, nonane-2-one...) également à l'origine de notes fruitées, fleuries ou d'herbes dans les fromages (Boutrou et Gueguen, 2005). Elles peuvent avoir d'autres effets bénéfiques tels que l'inhibition des moisissures indésirables dans les fromages (pour revue cf. Jakobsen et Narvhus, 1996). La plupart ne présente pas de risque sanitaire (cf. revue Jacques et Casaregola, 2008).

Les moisissures des fromages à pâte molle, croûte lavée ou fleurie appartiennent principalement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium* et *Scopulariopsis* (Lund *et al*, 1995). *Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium solitum* ou encore *Penicillium roqueforti* sont les espèces de *Penicillium* les plus fréquentes en surface des fromages (Lund *et al*, 1995). *Pen. roqueforti* forme des veines bleues dans les fromages de type « bleus » (Roquefort, Gorgonzola, Stilton...) et *Pen. camemberti* forme un manteau blanc sur les fromages Camembert et Brie. *Sporendonema casei* est important à la surface des fromages de type Cantal (Didienne, communication personnelle). Les espèces de *Mucor* font partie de la flore de surface des fromages St Nectaire et Tomme de Savoie (Dale, 1972 ; Michel *et al*, 2001). Les moisissures participent également à la désacidification du fromage en métabolisant le lactate en CO₂ et H₂O. Ils produisent des acides gras volatils de C4 à C20 et des méthylcétones dérivant d'acides gras à moyennes chaînes participant ainsi à l'arôme des fromages (Molimard et Spinnler, 1996 ; Vandamme, 2003). Les risques sanitaires associés à la présence de moisissures sont principalement la production de mycotoxines généralement par certaines espèces d'*Aspergillus*. La législation impose des concentrations en aflatoxine inférieure à 50 ng/kg pour les fromages (réglementation EC n°466/2001).

L'étude de Torkar et Vengust (2008) révèle que seuls 10 % des échantillons de fromages slovènes testés présentent des concentrations en aflatoxine supérieures à la limite autorisée.

2.3.3.7. Propriétés anti-listeria des levures et moisissures

Dieuleveux *et al* (1998) ont identifié une souche de *Geotrichum candidum* produisant des acides D-3-phényllactique et D-3-indollactique inhibiteurs de *L. monocytogenes*. Sur 304 isolats de levures issus de fromages, onze sont capables d'inhiber la croissance d'au moins 2 souches de *L. monocytogenes* sur membrane (Goerges *et al*, 2006). Parmi ces 11 isolats inhibiteurs, 10 sont des souches de *Candida intermedia* et un correspond à *Yarrowia lipolytica*. De même, en co-culture sur milieu solide, avec *L. monocytogenes*, 3 souches de *C. intermedia* et 1 souche de *Kluyveromyces marxianus* réduisent la croissance de *L. monocytogenes* de 3 log UFC/cm². Cette inhibition n'a pas pu être corrélée à la production de toxines (Goerges *et al*, 2006).

Dans des fromages à pâte molle de type bleu, *L. monocytogenes* est inhibée en présence de 4.6 mmol.Kg⁻¹ d'acide hexanoïque et d'acide octanoïque, acides pouvant être produits par *Pen. roqueforti*, avec une efficacité accrue à pH 5.0 (Kinderlerer et Lund, 1992).

2.3.3.8. Inhibition de *L. monocytogenes* dans les fromages par des consortiums complexes

Comme précisé au point 2.3.3, les différentes espèces microbiennes répertoriées dans les fromages présentent de nombreuses propriétés anti-listeria. Les espèces de bactéries, de levures et de moisissures dans des consortiums complexes en lien avec les procédés de fabrications interagissent pour faire barrière à *L. monocytogenes*.

Ainsi, des fromages de type St Nectaire fabriqués à partir de laits crus et âgés de 8 jours inhibent la croissance de *L. monocytogenes* à coeur (Millet *et al*, 2006). Ils sont caractérisés par la présence des espèces d' *Enterococcus saccharominimus*, *E. faecium*, *Chryseobacterium spp.*, *Cor. flavescens*, *Lc. garvieae* et *Lc. lactis* non productrices de substances de type bactériocine pouvant expliquer l'inhibition (Saubusse *et al*, 2007). Si la diminution du pH en dessous de 5,2 n'est pas suffisante pour inhiber la croissance de *L. monocytogenes*, la production d'acide lactique (D et L) contribuerait à l'inhibition (Saubusse *et al*, 2007).

A la surface de fromages à croûte lavée, des consortiums complexes définis constitués principalement de souches de *M. gubbeense*, *A. nicotianae*, *B. linens*, *Cor. casei*, *Halomonas sp.* réduisent de 3 log UFC/cm² la population de *L. monocytogenes* durant l'affinage (Bockelmann *et al*, 2005). De même, Mayr *et al*, (2004) ont identifié 3 consortiums

complexes issus de la surface de fromages présentant des capacités inhibitrices à 2 températures d'affinage. Deux des consortiums composés principalement de bactéries corynéformes : *Cor. casei*, *B. linens*, *M. gubbeenense* pour l'un et *A. nicotianae* et *Cor. casei* pour l'autre, inhibent totalement la croissance de *L. monocytogenes* tout au long de l'affinage à 13°C ou 16°C/12°C. En présence d'un troisième consortium caractérisé par la dominance de d'*A. nicotianae* et *B. linens*, *L. monocytogenes* se maintient en dessous du seuil de détection à une température d'affinage de 13°C (Mayr *et al*, 2004).

Maoz *et al* (2003) ont également révélé le fort potentiel anti-listeria de deux consortiums complexes issus de fromages à croûte lavée. Un consortium constitué de 94% de bactéries corynéformes (*Cor. variabile*, *B. linens* et *Cor. casei*) inhibe totalement *L. monocytogenes* à des niveaux de contamination faibles ou élevés (*L. monocytogenes* inoculée dans le lait à des niveaux de 10¹ à 10³ UFC/mL) tandis qu'un autre dominé par *A. nicotianae* et *B. linens* contrôle la croissance de *L. monocytogenes* à des niveaux de contamination faibles (70 ou 75 UFC/mL). Dans toutes ces études, l'inhibition n'a pas été attribuée à la production de substance de type bactériocine mais serait probablement liée à la composition microbienne et à l'association des différentes flores.

Les biofilms microbiens à la surface des étagères en bois pour l'affinage de fromages à pâte molle et croûte lavée, lorsqu'ils rentrent en phase stationnaire, inhibent la croissance de *L. monocytogenes* (Guillier *et al*, 2008).

Sur des supports au biofilm complexe ou dans les fromages avec des communautés microbiennes comportant une grande diversité de populations, la vie microbienne se combine aux facteurs abiotiques et joue un rôle majeur dans l'inhibition de *L. monocytogenes*. Comme nous l'avons précédemment souligné, de nombreuses espèces microbiennes d'intérêt technologique ont des potentialités inhibitrices (production de métabolites antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines...) mais leur expression dans les fromages n'est pas encore complètement élucidée. Ceci est en effet difficile à appréhender en raison des nombreuses interactions positives (commensalisme, synergie et mutualisme) ou négatives (compétition et antagonisme) entre les microorganismes et la complexité biochimique de la matrice. Celles-ci peuvent soit conduire à une synergie dans la production de métabolites inhibiteurs des bactéries pathogènes, soit au contraire engendrer leur dégradation (par exemple consommation d'acide lactique par les levures). Même sans propriétés inhibitrices particulières un seul microorganisme peut limiter le développement d'un autre microorganisme (pathogène) lorsqu'il est en quantité dominante. Cette inhibition non spécifique connue sous le nom d'effet «Jameson» résulterait de la consommation des

substrats de croissance par l'espèce numériquement dominante qui atteint rapidement sa densité maximum. Les substrats ne seraient alors plus disponibles pour les espèces en faible concentration et ayant des exigences similaires. Ainsi Mellefont *et al*, (2008) ont montré dans un milieu de laboratoire que de fortes concentrations (10^6 UFC/ml) d'*Escherichia coli*, *P. fluorescens* ou *Lb. plantarum*, pouvaient inhiber *L. monocytogenes* inoculée en faible concentration (10^3 UFC/ml) et que vice versa de fortes concentrations de *L. monocytogenes* (10^6 UFC/ml) pouvaient inhiber ces espèces quand inoculées à 10^3 UFC/ml.

Cette multiplicité de combinaison de facteurs abiotiques et biotiques conditionnant négativement (inhibition) ou positivement (croissance) le comportement des pathogènes rend difficile la prédiction de croissance de *L. monocytogenes* dans les fromages.

Cependant des modèles de croissance-décroissance ont été décrits. Ainsi, l'interface de croissance/non croissance de *L. monocytogenes* dans un fromage mexicain est définie en prenant en compte les concentrations en sel, l'*aw* et le pH (Bolton et Frank, 1999). Le Marc *et al*, (2002) ont proposé un modèle de croissance pour *L. monocytogenes* intégrant le pH et les teneurs en acides organiques (cf. paragraphe 2.3.3.2). L'interphase croissance-décroissance de *L. monocytogenes* dans un milieu nutritif a également été modélisée dans un modèle de régression en fonction de l'*aw*, du pH et de la quantité d'acide non dissocié (Gysemans *et al*, 2007). Ce modèle a été amélioré en 2009 en intégrant la densité cellulaire (Vermeulen *et al*, 2009).

2.3.3.9. Les barrières applicables au fromage Saint Nectaire

Dans cette thèse, nous avons choisi d'étudier l'effet de barrière des populations microbiennes dans le cas du fromage fermier St Nectaire. En effet, la technologie des pâtes pressée non cuite utilisée lors de la fabrication de ce fromage ne représente pas une barrière vis-à-vis de *L. monocytogenes* (cf. Tableau 3). Cependant, la grande diversité des productions (240 producteurs fermiers en 2010 pour une production de 6650 t de fromages) et des affinages, augurent une diversité de composition et d'équilibre des communautés microbiennes. Cette diversité pourrait être à l'origine d'un effet de barrière important vis-à-vis de *L. monocytogenes*. Comme précisé au paragraphe précédent des études réalisées sur la pâte des fromages St Nectaire un fort potentiel anti-listeria des populations microbiennes (Saubusse *et al*, 2007) lié à une diminution de pH et à la production d'acide lactique (D et L). En surface des fromages St Nectaire, des pH supérieurs à 6, un affinage court de 28 jours minimum à des températures de 6 à 12°C ne constituent pas des barrières efficaces.

En revanche, aux vues des résultats déjà obtenus à cœur des fromages la diversité microbienne pourrait avoir un rôle inhibiteur important.

Cette revue bibliographique montre que, malgré les connaissances acquises sur les potentialités inhibitrices des espèces microbiennes, l'inhibition dans les fromages par des communautés microbiennes complexes n'est pas encore totalement comprise. Aussi ce travail de thèse a essentiellement pour objectif de repérer des communautés microbiennes complexes de croûte de fromages aux propriétés anti-listeria et de tenter de reconstituer des communautés de composition plus simplifiée afin de pouvoir aborder la nature de l'inhibition.

Essais	Caractéristiques	Consortiums complexes	Préparation	Prélèvements (jours)
1	croûtes de fromages fermiers St Nectaire issus de la 1 ^{ère} campagne de collecte	34 consortiums complexes (TR1 à TR20 et TR22 à TR35)	cf. paragraphe 2.1.1	1, 8, 18, 28
2	croûtes de fromages fermiers St Nectaire issus de la 1 ^{ère} campagne de collecte après 3 mois de conservation à -20°C dans du tampon phosphate pH 7,5	5 consortiums complexes les plus inhibiteurs de <i>L. monocytogenes</i> : TR11.1.2, TR15.1.2, TR19.1.2, TR24.1.2, TR26.1.2	cf. paragraphe 2.1.1	1, 8, 11, 14, 18, 21, 25, 28
3	croûtes de fromages fermiers St Nectaire issus de la 1 ^{ère} campagne de collecte après 4 mois de conservation à -20°C dans du tampon phosphate pH 7,5	5 consortiums complexes les plus inhibiteurs de <i>L. monocytogenes</i> : TR11.1.3, TR15.1.3, TR19.1.3, TR24.1.3, TR26.1.3	cf. paragraphe 2.1.1	1, 8, 11, 14, 18, 21, 25, 28
4	croûtes de fromages fermiers St Nectaire issus de la 2 ^{ème} campagne de collecte (4 mois après la première)	5 consortiums complexes les plus inhibiteurs de <i>L. monocytogenes</i> : TR11.2, TR15.2, TR19.2, TR24.2, TR26.2	cf. paragraphe 2.1.1	1, 8, 11, 14, 18, 21, 25, 28
5	croûtes de fromages fermiers St Nectaire issus de la 3 ^{ème} campagne de collecte (16 mois après la première)	3 consortiums complexes les plus inhibiteurs de <i>L. monocytogenes</i> : TR15.3, TR19.3, TR26.3	cf. paragraphe 2.1.1	1, 8, 18, 28
6	croûtes de fromages fermiers St Nectaire issus de la 1 ^{ère} campagne de collecte en présence de 2 niveaux d'inoculum de <i>L. monocytogenes</i> (5 ou 50 UFC/cm ²)	consortium complexe TR15 + List 5 UFC/cm ² ou List 50 UFC/cm ²	cf. paragraphe 2.1.1	1, 5, 8, 11, 14, 18, 21, 25, 28
7	croûtes de fromages au lait pasteurisé inoculées avec le consortium complexe TR15 et récoltées après 8, 15, 18 et 28 jours d'affinage	consortium complexe issu de la propagation du TR15 : pTR15-8, pTR15-15, pTR15-18, pTR15-28	cf. paragraphe 2.1.2	1, 8, 18, 28
8	Fractions microbiologiques et biochimiques du consortium complexe TR15	TR15-C1, TR15-C2, TR15-S1, TR15-S2	cf. paragraphe 2.1.3 et figure 4	1, 8, 18, 28

Tableau 8 : Récapitulatif des différents consortiums complexes inoculés à la surface des fromages 80 g

Matériels et Méthodes

1. Fabrication des fromages au lait pasteurisé

Tous les fromages ont été fabriqués selon une technologie de type pâte pressée non cuite (type St Nectaire).

Le lait a été collecté à la ferme de l'Ecole Nationale des Industries Laitières et de la Viande (ENILV) d'Aurillac. Dès son arrivée au laboratoire, le lait a été mélangé puis pasteurisé à 72°C pendant 30 s (pasteurisateur Perialisi série PC15-2, Jesy-France) avant d'être transféré dans une cuve inox et la température ajustée à 32-33 °C. Après stabilisation de la température, le lait a été inoculé avec 0,6% d'un ferment MY800 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, Danisco, Sassenage, France) et avec *Penicillium commune* (2,5 mL/200 L) (Laboratoire Interprofessionnel de Production – LIP, Aurillac, France) entrant dans la composition d'un ferment de surface couramment utilisé en technologie St Nectaire. *Penicillium commune* est commercialisé sous le nom de *Penicillium blanc* et son identification est en cours de vérification. Puis, la présure (Beaugel 520-Ets Coquard, Villefranche sur Saône, France) a été ajoutée dans le lait (40 mL / 100 L). Après 45 min de durcissement, le décaillage suivi d'un brassage mécanique a été effectué. Un pré-pressage du caillé a été réalisé en cuve pendant 15 min après soutirage du lactosérum. Le caillé a ensuite été pesé et réparti dans des moules de 63 mm ou 210 mm de diamètre afin d'obtenir des fromages d'environ 80 ou 600 g. Les fromages de 80 g ont été utilisés dans les essais de criblage des propriétés anti-listeria des consortiums complexes et les fromages 600g dans les essais de reconstitutions de consortiums complexes. Après un pressage de 10 min, la surface des fromages a été salée avec 26 g de NaCl par fromage (fromage de 600 g). Les caillés ont été pressés 24 h à 2.0 Bars dans une enceinte à 25°C. Après 6 h de pressage, lorsque le pH du fromage était de 5,6 - 5,8, la température de l'enceinte a été réduite à 22°C. Après 24 h de pressage, les fromages de pH d'environ 5,2 ont été démoulés et séchés environ 1 h en salle de ressuyage avant d'être emballés sous vide et congelés à -20°C.

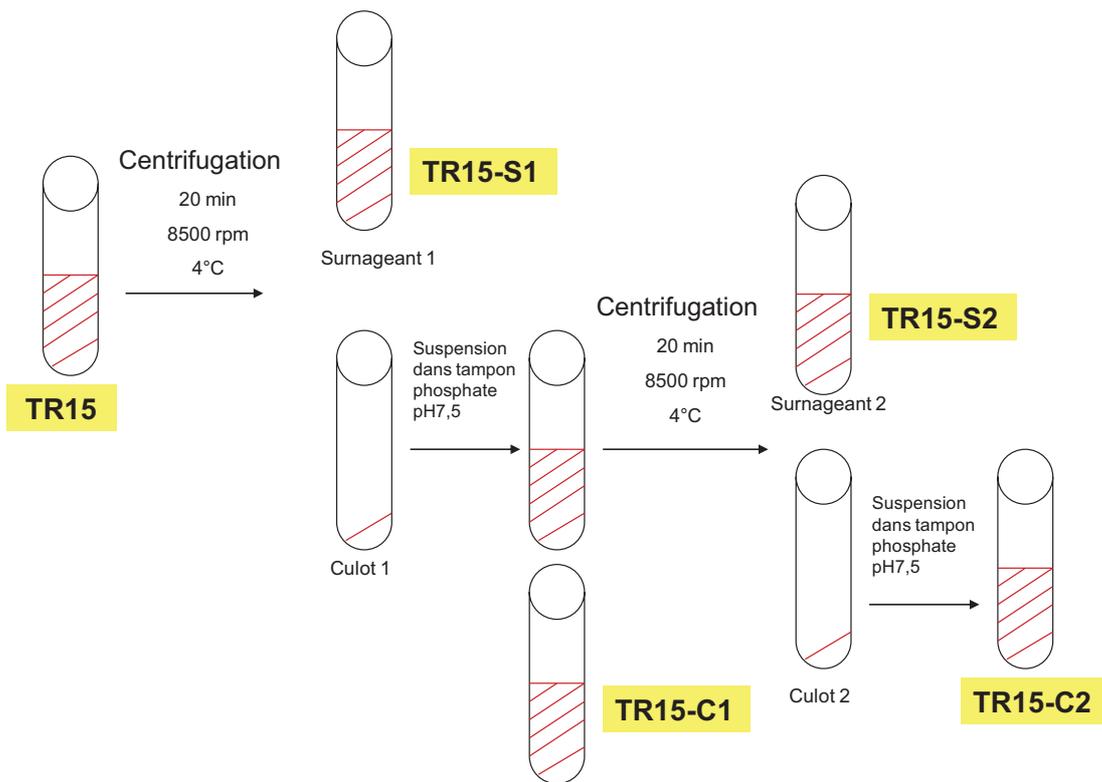


Figure 4 : Préparation des fractions microbiennes et biochimiques du consortium complexe TR15

TR15 = consortium complexe TR15, TR15-S1 = surnageant de la première centrifugation, TR15-C1 = culot de la première centrifugation re-suspendu dans tampon phosphate pH7,5, TR15-S2 = surnageant de la seconde centrifugation, TR15-C2 = culot de la seconde centrifugation re-suspendu dans du tampon phosphate pH7,5.

2. Préparation des consortiums inoculés à la surface des fromages

2.1. Préparation des consortiums complexes issus de croûtes de fromages fermiers St Nectaire

2.1.1. Préparation des 34 consortiums complexes issus de croûtes de fromages St Nectaire fermiers

Dans une première campagne de prélèvement, 34 fromages fermiers St Nectaire (TR1 à TR20, TR22 à TR35) issus de différents producteurs ont été collectés chez les affineurs de la zone AOC St Nectaire. Un quart des croûtes des fromages affinés 18 ou 28 jours ont été prélevés sur une épaisseur maximum de 3 mm à l'aide d'un couteau stérile. Chaque croûte a ensuite été diluée au 1/10^{ème} dans un tampon phosphate pH 7,5 (20 mM KH₂PO₄, 0,01 M K₂HPO₄) (Gomri, 1946) et broyée pendant 4 min à l'aide d'un stomacher (Mix 1, AES Laboratoire, Combourg, France). Les suspensions référencées par la suite comme consortium complexe (TRx) ont ensuite été aliquotées dans des tubes stériles puis congelées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Dans une deuxième campagne de prélèvements (4 mois après la première), des fromages (TR11.2, TR15.2, TR19.2, TR24.2, TR26.2) ont été collectés chez les mêmes producteurs et affineurs ayant fourni les fromages dont les consortiums étaient les plus inhibiteurs de *L. monocytogenes* au vu des résultats de la première campagne. Une troisième campagne de prélèvements a été répétée, 16 mois après la première (TR15.3, TR19.3, TR26.3). Les consortiums ont été préparés selon le même protocole que ceux de la première campagne (Tableau 8).

2.1.2. Préparation de consortiums complexes issus de la propagation du consortium complexe TR15

Des fromages 80 g ont été décongelés 1h30 sous hotte à flux laminaire à température ambiante. Le consortium complexe TR15 a été décongelé dans un bain-marie à 25°C. Chaque face des fromages a ensuite été inoculée avec 0,25 mL du consortium complexe TR15. Les fromages ont été affinés 28 jours dans des boîtes inox stériles dans une cave à 9°C, 98% d'humidité relative. Les croûtes des fromages ont été prélevées à 8, 15, 18 et 28 jours d'affinage et les consortiums préparés comme décrit au point 2.1.1 et nommés pTR15-8, pTR15-15, pTR15-18 et pTR15-28 (Tableau 8).

Milieu	Incubation		Cible présumée	Références
	Temps (jours)	Température (°C)		
Facultatively Heterofermentative (FH) ¹	3	30	Lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs	Isolini et al, 1990
Mayeux Sandine Elliker (MSE)	3	30	Leuconostocs producteurs de dextrane	Mayeux et al, 1962
Slanetz Bartley (SB)	2	42	Entérocoques	Slanetz et Bartley, 1957
Rabbit Plasma Fibrinogen	1 à 2	37	Staphylocoques à coagulase positive et bactéries d'affinage	De Buyser et al, 1999
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	5 et 10	25	Bactéries d'affinage, bactéries à Gram positif	Denis et al, 2001
Plate Count Agar + Lait + inhibiteur de bactéries à Gram positif	3	30	Bactéries à Gram négatif	IDF 100B, 1991
Cephalidine Fucidine Cetramidine (CFC)	1 à 2	25	Pseudomonas	NF V04-504, 1988
Oxytetracyclin Glucose Agar (OGA)	3 à 4	25	Levures et moisissures	IDF 94B, 1991
Plate Count Agar + Lait (PCA+L)	3 à 5	25	Flore totale	
Brain Heart Infusion + agar (BHI)	3 à 5	25	Flore totale	Rosenow, 1919

Tableau 9 : Conditions de dénombrements des flores microbiennes

Milieux de cultures, temps et température en degrés Celsius

¹Milieu FH incubé en condition d'anaérobiose

2.1.3. Préparation de consortiums à partir des culots et surnageants issus du consortium complexe TR15

Le consortium complexe TR15 a été décongelé dans un bain-marie à 25°C puis centrifugé 20 min à 8500 rpm, à 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Ilkrich, France). Le surnageant issu de cette première centrifugation a été prélevé pour constituer le consortium TR15-S1. Le culot correspondant a été re-suspendu dans du tampon phosphate pH 7,5 constituant le consortium TR15-C1. Une aliquote de cette suspension a été centrifugée 20 min à 8500 rpm et à 4°C. Le surnageant de cette deuxième centrifugation constituait le consortium TR15-S2 et le culot correspondant a été re-suspendu dans du tampon phosphate pour constituer le consortium TR15-C2 (Tableau 8 et Figure 4).

2.2. Préparation des communautés microbiennes reconstituées

2.2.1. Constitution de collections d'isolats issus du consortium complexe TR15

Une première collection d'isolats d'espèces bactériennes, de levures et de moisissures a été constituée à partir d'isolats prélevés sur des fromagesensemencés avec le consortium complexe TR15. Le consortium complexe TR15 a été inoculé à la surface de fromages au lait pasteurisé affinés pendant 28 jours à 9°C, 95% d'humidité relative. Les flores microbiennes capables de se développer à la surface des fromages ont été dénombrées sur 9 milieux de cultures différents (milieux détaillés Tableau 9) à différents temps d'affinage (1, 8, 11, 18, 21, 25 et 28 jours). Un total de 115 colonies de bactéries, levures et moisissures ont été prélevées et purifiées à partir des milieux de dénombrements présentant les plus grands nombres de morphotypes différents (Tableau 10).

Une seconde collection a été constituée par analyse de la composition initiale du consortium complexe TR15. Le consortium complexe TR15 a été inoculé directement sur les différents milieux de cultures. Au total, 92 isolats représentant les différents morphotypes ont été prélevés.

2.2.2. Identification des isolats

Les isolats de ces 2 collections ont été purifiés sur milieux gélosés puis identifiés. Les isolats de ces 2 collections ont été cultivés dans des bouillons de cultures et à des températures appropriées (Tableau 11). Les ADN totaux de chaque culture d'isolat ont été extraits à l'aide du kit Easy DNA (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNr 16S et 26S ont ensuite été amplifiés à l'aide des couples d'amorces

Milieu de dénombrement	Nombre de morphotypes distingués	Temps de prélèvement de la croûte (jours)	Nombre d'isolats prélevés
FH = Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	2	11	16
MSE = Leuconostocs producteurs de dextrane	2	11 et 18	10
SB = Enterocoques	1	25	10
RPF = Staphylocoques	2	18 et 21	11
CRBM = bactéries à Gram positif	6	21 et 28	30
CFC = Pseudomonas	1	28	8
PCA+L+CV = bactéries à Gram négatif	1	18	10
OGA = levures et moisissures	6	18	17 levures 3 moisissures
Total			115

Tableau 10 : Nombre de morphotypes, temps de prélèvements et nombre d'isolats prélevés sur les milieux pour la collection 1

Milieu gélosé d'origine	Conditions de culture des isolats		
	bouillon	T°C	temps (jours)
Facultatively Heterofermentative (FH)	MRS	30	2 à 3
Mayeux Sandine Elliker (MSE)	BHI	30	2
Slanetz Bartley (SB)	M17	42	2
Rabbit Plasma Fibrinogen	BHI	37	2
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	BHI	25	4 à 5
Plate Count Agar + Lait + inhibiteur de bactéries à Gram positif	BHI	30	2
Cephalidine Fucidine Cetrמידine (CFC)	BHI	30	2
	YPG	25	3 à 4
Oxytetracyclin Glucose Agar (OGA)	Moisissures sur gélose inclinée	25	5 à 10
	OGA		

Tableau 11 : Conditions de culture des isolats en fonction du milieu d'origine

T°C : température en degrés Celsius

nucléotidiques universelles WO2 et W18 ou NL1 et NL4 (cf. Tableau 12) comme décrit par Callon *et al.*, (2006).

Pour l'identification des isolats bactériens, les ADNr 16S ont été triés à l'aide de la méthode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) comme décrit par Callon *et al.* (2007). Les profils de restriction des ADNr 16S obtenus par digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HaeIII* ont été comparés à la base de données du laboratoire à l'aide du logiciel Bionumerics par application de la méthode UPGMA. Les profils présentant au minimum 80-90 % de similarité (d'après le coefficient de corrélation de Pearson) ont été rassemblés dans un même groupe. Chaque groupe créé a ensuite été assigné à un genre bactérien par comparaison des profils de restriction des isolats aux profils de la banque de référence. Cette banque de référence était composée de 109 espèces bactériennes issues de la collection du laboratoire et comprenait 27 souches de bactéries lactiques, 56 souches de bactéries non lactiques dont 19 souches de Staphylocoques et 26 souches de bactéries à Gram négatif.

Les isolats de bactéries lactiques présumés être des lactobacilles, leuconostocs ou entérocoques ont été identifiés par amplification à l'aide d'amorces spécifiques décrites dans la littérature (Tableau 12).

Les ADNr 16S de 1 à 10 isolats de chaque groupe ont été séquencés à l'aide de l'amorce nucléotidique W34 par GeneCust (Evry, France) ou Agowa (Berlin, Allemagne). Chaque séquence a été comparée aux séquences disponibles dans la banque de données Genbank à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), permettant l'alignement des séquences nucléotidiques identiques. Une similarité supérieure ou égale à 99% entre les séquences a été prise en compte afin d'attribuer un nom d'espèce aux isolats.

Les levures ont été identifiées par une combinaison de tests phénotypiques et par séquençage des ADNr 26S comme décrit par Callon *et al.* (2007).

Les moisissures ont été identifiées au niveau genre après examen microscopique.

2.2.3. Clonage et séquençage du consortium complexe TR15

Afin d'obtenir une image complète de la communauté microbienne constituant le consortium complexe TR15, sa composition a été établie par clonage et séquençage indépendamment de la culture et de l'isolement des microorganismes. Les ADN totaux du consortium complexe TR15 de départ ont été extraits à partir d'1 g de croûte de fromage par méthode phénol chloroforme comme décrit par Delbès *et al.* (2007). Les ADNr 16S amplifiés à partir des ADN totaux extraits ont ensuite été clonés à l'aide du kit de clonage Zero Blunt TOPO PCR

Amorces nucléotidiques	Espèces ciblées	Séquences nucléotidiques des amorces	Conditions de PCR	Cible nucléotidique	Références
w02	Amorces universelles pour l'amplification des ADNr 16S bactériens	GNTACCTTTGTTACGACTT	25 cycles : 30 s à 94°C, 30 s à 50°C, 90 s à 72°C	SSU ADNr 16S	Godon <i>et al.</i> , 1997
w18		GAGTTTGATCMTGGCTCAG			
W34	Amorces universelles pour l'amplification d'une région des ADNr 16S bactériens	TTACCGCGGGCTGTGGCAC	30 cycles : 30 s à 96°C, 30 s à 61°C, 30 s à 72°C	SSU ADNr16S	Zumstein <i>et al.</i> , 2000 Delbès <i>et al.</i> , 1998
W49		ACGGTCCAGACTCCTACGGG			
Gram1F	Amorces universelles pour l'amplification d'une région des ADNr 16S bactériens	CCTAATAACATGCAAGTCG	30 cycles : 30 s à 96°C, 30 s à 52°C, 45 s à 72°C	SSU ADNr16S	Saubusse, 2007
Gram2R		CTCAGTCCCAATGTGGCC			
n11	Amorces universelles pour l'amplification des ADNr 26S des levures	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	30 cycles : 30 s à 94°C, 30 s à 57°C, 30 s à 72°C	ADNr 26S	Kurtzmann et Robnett, 1997
n14		GGTCCGTGTTCAAGACGG			
Paracasei 16S	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	CACCGAGATTCAACATGG	30 cycles : 60 s à 94°C, 00 s à 53°C, 60 s à 72°C	ADNr 16S	
16rev		GAAAGGAGGTGATCCAGC			
16 forward	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GCTGGATCACCTCCTTTC	30 cycles : 60 s à 94°C, 00 s à 53°C, 60 s à 72°C	région intergénique des ADNr16S/23S	Berthier <i>et al.</i> , 1999
Lpl		ATGAGGTATTCAACTTATT			
16 forward	<i>Lactobacillus curvatus</i>	GCTGGATCACCTCCTTTC	30 cycles : 60 s à 94°C, 00 s à 53°C, 60 s à 72°C	ADNr 16S	
Lc		TTGGTACTATTTAAATTCCTTAG			
Lnm1	<i>Leucomostoc mesenteroides / pseudomesenteroides</i>	TGTCGCATGACACAAAAAGTTA	25 cycles : 30 s à 94°C, 30 s à 62°C, 90 s à 72°C	ADNr 16S position sens 185 ADNr16S position antisens 470	Cibick <i>et al.</i> , 2000
Lnm2		ATCATTTCTATTCTAGGTG			
Lncit1	<i>Leucomostoc citreum</i>	ACTTAGTATCGCATGATATC	30 cycles : 30 s à 94°C, 30 s à 58°C, 90 s à 72°C	ADNr 16S position sens 183 ADNr 16S position antisens 1326	
Lncit2		AGTCGAGTTGCAGACTGCAG			
ddlE1	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT	30 cycles : 60 s à 94°C, 60 s à 54°C, 60 s à 72°C	gène de résistance aux glycopeptides	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
ddlE2		ACGATTCAAAAGCTAACTG			
ddlF1	<i>Enterococcus faecium</i>	TAGAGACATTGAATATGCC	30 cycles : 60 s à 94°C, 60 s à 54°C, 60 s à 72°C		
ddlF2		TCGAATGTGCTACAATC			

Tableau 12 : Amorces PCR utilisées dans cette étude

SSU : small subunit = petite sous-unité

(Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les clones obtenus ont été séquencés comme décrit au paragraphe 2.2.2.

2.2.4. Propriétés anti-listeria des souches *in vitro*

Les propriétés anti-listeria des isolats de bactéries et levures ont été testées *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé décrite par Tagg et McGiven (1971) modifiée par l'utilisation d'une double couche de milieu gélosé. Chaque souche a été cultivée dans un bouillon et incubée dans des conditions favorisant sa croissance (Tableau 11). La culture obtenue a été centrifugée à 8500 rpm, 10 min, à 4°C (centrifugeuse SIMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). Le pH du surnageant récolté a été ajusté à pH 6 à l'aide de soude 1M, puis filtré sur filtre d'ester mixte de cellulose de 0,45 µm pour obtenir l'extrait de culture (Minisart Sartorius, Hannover, France).

Parallèlement des boîtes de Pétri ont été préparées comme suit : une première couche de gélose (20 mL) favorisant la croissance de la souche testée 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*. Après solidification, des puits ont été creusés à travers la couche supérieure à l'aide de cônes stériles. Les boîtes ont ensuite été séchées à 55 °C pendant 10 min avant le remplissage des puits avec 100 µL d'extrait de culture. Après diffusion des extraits de culture dans la gélose, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 h, puis examinées pour la présence de zones d'inhibition autour des puits. L'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du puits.

L'inhibition de la souche indicatrice *Micrococcus luteus* CIPA270 sensible à la nisine par la souche de *Lc. lactis* ATCC 11451 productrice de nisine a été utilisée comme témoin de la méthode.

2.2.5. Préparation et conservation des souches pour la constitution de consortiums

Chaque isolat a été cultivé dans 10 mL de bouillon et dans des conditions de température et d'agitation adaptées aux espèces cultivées (Annexe 1). Chaque culture a ensuite été centrifugée 15 min à 5000 rpm et 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Ilkrich, France). Le culot a été re-suspendu dans du lait écrémé stérile additionné de 15% de glycérol et de 0,5% d'acide ascorbique pour les bactéries à Gram positif et dans du lait écrémé stérile additionné de 15% de glycérol pour les bactéries à Gram négatif et les levures. Pour chaque souche, un lot de 10 tubes contenant 1,8 mL de suspension microbienne a été préparé et congelé à -80°C. Pour chaque reconstitution, chaque souche a été pré-cultivée dans 10 mL

Groupe	Espèces microbiennes	Reconstitution 1		Reconstitution 2		Reconstitution 3		Préparation
		Inoculum log UFC/cm ²	temps de prélèvements (jours)	Inoculum log UFC/cm ²	temps de prélèvements (jours)	Inoculum log UFC/cm ²	temps de prélèvements (jours)	
A = Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2		2,7		2,7 ou 0		
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Carnobacterium mobile</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Arthrobacter nicotianae</i> ou <i>arilaitensis</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Arthrobacter ardayensis</i> ou <i>bergerei</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Staphylococcus pulvereri</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Staphylococcus xylosum</i>	2		2,7		2,7		
B = Bactéries à Gram positif et catalase positive	<i>Brevibacterium linens</i> ou <i>casei</i>	2	1, 5, 8, 11,	2,7		2,7		
	<i>Brevibacterium antiquum</i> ou <i>casei</i>	2	14, 18, 21,	2,7	1, 8, 18, 28	2,7	1, 8, 18, 28	
	<i>Brachybacterium sp.</i>	2	25, 28	2,7		2,7		cf. paragraphe 2.2.6
	<i>Protetis vulgaris</i>	1		1		1		
C = Bactéries à Gram négatif	<i>Serratia proteomaculans</i>	1		1		1		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ou <i>syringae</i>	1		1		1		
	<i>Candida sake</i>	2		2,7		2,7		
D = Levures	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2		2,7		2,7		
	<i>Geotrichum sp.</i>	0,3		-		-		
E = Moisissures	<i>Mucor sp.</i> (poils ras)	0,3		-		-		
	<i>Mucor sp.</i> (poils longs)	0,3		-		-		
Combinaisons inoculées								
		ABCDE, ABCD, ABCE, ABDE, ACDE, BCDE		ABCD, ABC, ABD, ACD		ABCD, A(-)BCD		

Tableau 13 : Souches inoculées, niveaux d'inoculations et temps de prélèvements dans les essais de reconstitutions.

de bouillon et dans des conditions de température et d'agitation adaptées aux espèces avant d'être conservée dans du lait écrémé stérile additionné de 15% de glycérol et à -20°C jusqu'à inoculation. Les surfaces des fromages ont étéensemencées à partir d'un tube décongelé (Annexe 1), dénombré et dilué dans du tampon phosphate pH 7,5 immédiatement avant son utilisation.

Dans le cas des 3^{ème} et 4^{ème} séries de reconstitution, la souche de *Leuconostoc mesenteroides* a été pré-cultivée dans un bouillon MRS pendant 72 h à 30°C au lieu d'un bouillon BHI initialement utilisé (Annexe 1).

2.2.6. Reconstitution de consortiums à partir des souches des collections 1 et 2

Etant donné, qu'aucune souche testée de la collection 1 ne présentait de propriétés anti-listeria par test de diffusion en milieu gélosé, une souche par espèce identifiée a été sélectionnée afin de reconstituer des consortiums. Vingt deux souches ont été réparties en 5 groupes définis comme suit : le groupe A (bactéries lactiques), avec 6 souches, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Marinilactibacillus psychrotolerans* et *Carnobacterium mobile* ; le groupe B (bactéries à Gram positif et catalase positive) avec 7 souches, *Arthrobacter ardleyensis* ou *bergerei*, *Arthrobacter nicotianae* ou *arilaitensis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus pulvereri*, *Brevibacterium antiquum* ou *casei*, *Brevibacterium linens* ou *casei* et *Brachybacterium sp.* ; le groupe C (bactéries à Gram négatif) avec 3 espèces, *Pseudomonas fluorescens* ou *syringae*, *Serratia proteomaculans* ou *liquefaciens* et *Proteus vulgaris* ; le groupe D (levures) avec 3 espèces, *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii* et *Yarrowia lipolytica*, et le groupe E (levure et moisissures) avec 1 souche de *Geotrichum sp.* et 2 moisissures *Mucor sp.* (Poils longs), *Mucor sp.* (Poils ras). Différents consortiums plus ou moins complexes ont été constitués à partir de l'association de l'ensemble des 5 groupes microbiens (ABCDE) ou en omettant l'un des groupes (Reconstitution 1). Pour les reconstitutions 2 et 3, les consortiums ont été constitués à partir de l'association des 4 groupes A, B, C, D comme défini dans le Tableau 13. Enfin pour la reconstitution 4, 56 souches des collections 1 et 2 issues du consortium complexe TR15 ont été pré-cultivées dans les milieux appropriés et préparées comme décrit au point 2.2.5. Deux consortiums ont été constitués puis inoculés à la surface des fromages (tableau 15) :

- Consortium ABCD₂ : composé des 56 souches représentant les 19 espèces identifiées à partir du consortium complexe TR15.

	Niveau de flore dans consortium TR15 inoculé (log UFC/cm ²)	Inoculum (log UFC/cm ²) BR	Inoculum (log UFC/cm ²) BR+	Inoculum (log UFC/cm ²) BHI	Temps de prélèvements des croûtes (jours)
Lactobacilli (FH)	3,26	3,26	4,26	-	
Enterococci (SB)	1,54	1,54	1,54	-	
Leuconostocs D+ (MSE)	2,22	2,22	3,22	-	
Bactéries à Gram positif (CRBM)	3,92	3,92	3,92	-	1, 8, 14,
Staphylococci (RPF)	1,2	1,2	1,2	-	18, 21, 28
Bactéries à Gram négatif (PCA+L+CV)	1,54	1,54	1,54	-	
Levures et Moisissures (OGA)	1,68	1,68	1,68	-	
flore totale sur BHI	6,71	-	-	6,71	

Tableau 14 : Niveaux d'inoculations des flores et temps de prélèvements des croûtes en fonction du consortium reconstitué (4^{ème} série de reconstitution)

Groupe	Identification	Nombre de souches inoculées	Inoculum log UFC/cm ² dans consortium ABCD ₂	Inoculum log UFC/cm ² dans consortium A(+) ₂ BCD ₂	temps de prélèvements des croûtes (jours)
A = Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	12		4,26	
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2	3,26		
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5	2,22	3,22	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	1,54	1,54	
	<i>Carnobacterium mobile</i>	1			
	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	5	3,92	3,92	
B = Bactéries à Gram positif et catalase positive	<i>Arthrobacter nicotianae</i> ou <i>arilaitensis</i>	3			
	<i>Arthrobacter ardleyensis</i> ou <i>bergerei</i>	4			
	<i>Brevibacterium linens</i> ou <i>casei</i>	2	3,92	3,92	
	<i>Brachybacterium sp.</i>	1			1, 8, 14, 18, 21, 28
	<i>Brevibacterium antiquum</i> ou <i>casei</i>	1			
	<i>Staphylococcus pulvereri</i>	2	1,2	1,2	
C = Bactéries à Gram négatif	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1			
	<i>Proteus vulgaris</i>	1			
	<i>Serratia proteomaculans</i>	1	1	1	
D = levures	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ou <i>syringae</i>	2			
	<i>Candida sake</i>	7			
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2	1,68	1,68	
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	3			

Tableau 15 : Souches des collections 1 et 2, niveaux d'inoculations des consortiums reconstitués et temps de prélèvements des croûtes (4^{ème} série de reconstitution)

- Consortium A(+)BCD₂ : consortium composé des 56 souches représentant les 19 espèces identifiées à partir du consortium complexe TR15. Les 14 souches de *Lactobacillus* et les 5 souches de *Leuconostoc* ont été inoculées à une concentration 10 fois plus élevée.

2.2.7. Préparation de consortiums à partir des pools d'isolats cultivables issus du consortium complexe TR15.

Le consortium TR15 a été inoculé sur les milieux gélosés sélectifs ou non sélectifs suivant : FH, MSE, SB, CRBM, RPF, PCA+L+CV, OGA et BHI. Les colonies ayant poussé sur les différents milieux gélosés ensemencés avec une même dilution du consortium complexe TR15 ont été raclées et suspendues dans 2 mL de tampon phosphate pH 7,5. Les suspensions obtenues ont été centrifugées à 5000 rpm, 15 min et 4°C, puis le surnageant a été éliminé et le culot re-suspendu dans 2 mL de tampon phosphate. L'opération a été répétée une nouvelle fois avant congélation des suspensions à -20°C. Avant la préparation des consortiums, les suspensions ont été décongelées dans un bain-marie à 25°C puis dénombrées. Les consortiums suivants ont été préparés (Tableau 14) puis inoculés à la surface des fromages :

- Consortium BR : consortium issu du pool des microorganismes cultivables obtenue sur les milieux FH (286 UFC), MSE (528 UFC), SB (91 UFC), RPF (207 UFC), CRBM (650 UFC), PCA+L+CV (342 UFC), et OGA (64 UFC)
- Consortium BR+ : même consortium que BR mais avec une concentration 10 fois plus élevée pour les bactéries cultivées sur les milieux FH et MSE.
- Consortium BHI : consortium issu des microorganismes cultivables sur le milieu BHI (526 UFC).

Ces consortiums reconstitués ont été inoculés lors de la reconstitution 4.

3. Inoculation des surfaces des fromages fabriqués à partir de lait pasteurisé

Les fromages fabriqués à partir de lait pasteurisé ont été décongelés 1 h30 (fromages de 80g) à 5 h (fromages de 600g) à température ambiante sous hotte à flux laminaire. Les fromages ont été retournés toutes les 30 min (fromages 80g) et toutes les heures (fromages 600g) afin d'éliminer l'excès d'eau.

3.1. Inoculation par *Listeria monocytogenes*

La souche de *L. monocytogenes* S1, de séro groupe moléculaire IVb, et de ribotype DUP 1038, isolée d'un fromage St Nectaire (Millet *et al*, 2006) a été utilisée pour cette étude.

Après vérification de la pureté sur milieu gélosé ALOA (AES, Combourg, France), la souche a été pré-cultivée dans un bouillon caséine soja additionné de 0,6% d'extrait de levure pendant 18 h à 37°C. La culture a ensuite été centrifugée 15 min à 5000 rpm et 4°C (centrifugeuse SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Ilkrich, France). Le culot bactérien a été re-suspendu dans du lait écrémé stérile additionné de 15% de glycérol. La suspension de *L. monocytogenes* a été aliquotée par 1,8 mL puis congelée à -20°C jusqu'à inoculation. Pour chaque essai, la souche a été pré-cultivée et conservée de la même façon. Les surfaces des fromages ont ensuite étéensemencées à partir d'un tube décongelé, dénombré et dilué dans du tampon phosphate pH 7,5 immédiatement avant son utilisation.

Dans tous les essais, *L. monocytogenes* S1 a été inoculée à 2 - 5 UFC/ cm² à la surface des fromages. Un essai a été réalisé avec un inoculum de 50 UFC/cm² (Essai 6).

Chaque essai incluait également des fromages contrôle inoculés avec un ferment de surface commercial couramment utilisé lors de la fabrication du St Nectaire (*Penicillium commune* 3.10⁴ UFC/cm², LIP, Aurillac).

3.2. Inoculation des croûtes de fromages avec les différents consortiums

3.2.1. Inoculations des consortiums complexes

Les consortiums complexes ont été inoculés sur la surface des fromages en 8 séries d'essais comme résumé dans le tableau 8.

Pour les 8 séries d'essais, chaque face des fromages de 80 g d'une superficie de 32,15 cm² a été inoculée avec 0,25 mL de consortium complexe préparé comme décrit aux paragraphes 2.1.1, 2.1.2 et 2.1.3.

Pour chaque série d'essai, des fromages contrôle uniquement inoculés avec *Penicillium commune* servaient de référence pour la croissance de *L. monocytogenes*.

3.2.2. Inoculations de consortiums reconstitués

Les propriétés anti-listeria des consortiums reconstitués ont été testées en 4 séries de reconstitutions comme résumé dans les tableaux 13, 14 et 15.

Chaque face de fromage de 600g d'une superficie de 132,73 cm² a été inoculée avec 1 mL de consortiums reconstitués préparés comme décrit aux paragraphes 2.2.5, 2.2.6 et 2.2.7.

Les combinaisons, niveaux d'inoculation des souches ou pool de souches des différents consortiums reconstitués sont précisés dans les tableaux 13, 14 et 15. Les niveaux inoculés ont été définis en moyennant les résultats des différents dénombrements des flores microbiennes du consortium complexe TR15.

Pour les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} séries de reconstitution, le consortium complexe TR15 (issu de la première campagne de collecte et conservé à -20°C) a également été inoculé et a servi de contrôle de l'inhibition de *L. monocytogenes*. Pour chaque série de reconstitution, des fromages contrôle uniquement inoculés avec *Penicillium commune* servaient de référence pour la croissance de *L. monocytogenes*.

3.3. Affinage et prélèvements

Tous les fromages des différentes séries d'essais et de reconstitutions ont été affinés dans des boîtes inox stériles placées dans une cave à 9°C, 98% d'humidité relative. A 8 et 18 jours d'affinage, les fromages ont été lavés avec une saumure (20% NaCl) à l'aide de lingettes stériles.

Les croûtes des fromages ont été prélevées sur une épaisseur maximum de 3 mm à l'aide d'un couteau stérile aux différents temps d'échantillonnages répertoriés dans les tableaux 8, 13, 14, 15.

Les croûtes des fromages des différentes séries d'essais et de reconstitutions ont été conservées à -20°C avant analyses microbiologiques et biochimiques. Seules les mesures de pH, d'extraits secs et le dénombrement de *L. monocytogenes* ont été effectués immédiatement après le prélèvement.

4. Analyses Microbiologiques

4.1. Dénombrements des flores microbiennes sur les milieux de cultures

L. monocytogenes a été dénombrée selon la norme ISO 112090-2 par le Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières (LIAL, Aurillac, France) sur la croûte d'un demi (fromage 80 g) ou d'un quart (fromage 600 g) de fromage prélevé.

La croûte d'un second quart de fromage prélevée sur chaque face a été broyée dans du tampon phosphate pH 7,5 (dilution au 1/10^{ème}) à l'aide d'un stomacher (MiniMix, Interscience, St Nom la Bretèche, France). Les suspensions de croûtes ont ensuite été diluées dans une solution de Ringer puisensemencées sur les milieux de culture gélosés à l'aide d'un ensemeur spiral (DS+, Interscience, St Nom la Bretèche, France). Les milieux sont répertoriés Tableau 9. Les compositions et modes de préparations des milieux sont détaillés en Annexe 2.

Dans le cas des essais de reconstitution, certaines espèces formant des colonies caractéristiques ont été dénombrées suivant leur aspect sur les différents milieux de culture à partir d'un référentiel d'aspect créé à partir des souches identifiées dans le consortium complexe TR15.

Les niveaux des flores microbiennes ont été exprimés en log d'Unité Formant Colonie (UFC) par cm² de croûte de fromage.

Afin de quantifier les différences de croissance de *L. monocytogenes* entre les fromages inoculés avec un consortium complexe ou un consortium reconstitué et le contrôle (uniquement inoculé avec *Penicillium commune*) durant l'affinage, l'aire d'inhibition (AI) entre 2 temps d'affinage (t1 et t2) a été calculée selon la formule de Wenzel et Marth (1990) :

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

Où C est le niveau de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages inoculés avec les consortiums complexes ou reconstitués

T est le niveau de *L. monocytogenes* sur les fromages contrôle.

4.2. Analyse des isolats bactériens des milieux de dénombrements CRBM et BHI

Des colonies ont été prélevées sur les milieux de dénombrements CRBM et BHI puis conservées sur Clone Saver (Whatman, Dutscher, Illkirch, France). Les Clone Saver permettent de conserver les ADN de colonies microbiennes sans passer par une extraction d'ADN classique avec la possibilité de réaliser directement des amplifications par PCR. Les ADN des colonies prélevées ont été fixés et stabilisés sur une carte de type buvard conservée ensuite à l'abri de la lumière et de l'humidité. L'ADNr 16S des 137 clones a été amplifié par PCR directement à partir d'un poinçon d'1 mm de diamètre découpé dans la carte. Les ADNr 16S ont ensuite été séquencés comme indiqué dans le paragraphe 2.2.2.

4.3. Analyse par Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

4.3.1. Préparation des acides nucléiques

Les ADN totaux ont été extraits directement à partir des croûtes des fromages selon la méthode phénol chloroforme décrite par Delbès *et al*, (2007). Un gramme de croûte de fromage a tout d'abord été broyé 2 min à 30 Hz dans 1 mL de tampon de thiocyanate de guanidine (4M) et Tris (0,1M) additionné de 100 µL d'une solution à 10% de N-lauroylsarcosine dans un récipient inox muni d'une bille inox (1 cm de diamètre) à l'aide d'un vibrobroyeur MM200 (Kurt Retsch, GmbH, Haan, Allemagne). Un tube de 2 mL contenant 250 µL de suspension de croûte broyée a été complété avec 200 mg de billes de zirconium

(0,1 mm de diamètre), 50 μ L d'une solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 20%, 200 μ L de tampon phosphate pH 8, 200 μ L d'une solution d'acétate de sodium (50 mM) contenant 10 mM d'EDTA et 200 μ L de phénol-chloroforme alcool isoamylique (25/24/1) pH 8. Le tube contenant le mélange a ensuite été agité 2 min à 30 Hz à l'aide du vibrobroyeur avant d'être chauffé pendant 2 min dans un bain-marie à 80°C puis refroidi 2 min sur de la glace. L'opération a été répétée 2 fois. Le contenu des tubes a ensuite été transféré dans des tubes Phase Lock Gel (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) puis centrifugé 3 min à 3000g et à 4°C. Un millilitre de phénol-chloroforme alcool isoamylique (25/24/1) pH 8 a été ajouté dans les tubes avant centrifugation 3 min à 3000g et à 4°C. L'opération a été répétée 2 fois. Pour finir, 1 mL de chloroforme alcool isoamylique a été ajouté dans chaque tube avant une dernière centrifugation 3 min à 3000 g et à 4°C. La phase aqueuse a été prélevée puis transférée dans un tube pour précipitation des ADN totaux à l'aide d'éthanol absolu comme décrit par Duthoit *et al* (2003).

Les ADN totaux de l'ensemble des colonies cultivables sur le milieu CRBM récoltées dans 1 mL de tampon thiocyanate de guanidine ont été extraits de la même façon.

4.3.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Les amplifications PCR ont été réalisées à partir des ADN totaux extraits des croûtes de fromages, de l'ensemble des isolats bactériens du milieu CRBM et des souches cultivées sur un milieu adapté. Les régions ciblées de l'ADNr 16S (V3 ou V2) ont été amplifiées dans 25 μ L de mélange réactionnel contenant : 2,5 μ L de chacune des amorces nucléotidiques (10 μ M), 1 μ L d'un mix des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) (2,5 mM), 0,5 μ L de polymérase ISIS (1 U/ μ L) et 1 μ L d'ADN dans un tampon 1X. Les programmes d'amplification sont indiqués dans le Tableau 12.

4.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les électrophorèses des produits d'extraction des ADN totaux ont été réalisés sur gel d'agarose 0,8% et les produits de PCR sur gel d'agarose 1,5 % dans un tampon Tris Borate EDTA (89 mM Tris base, 89 mM borate, 2 mM EDTA) contenant 5 % de bromure d'éthidium. Les ADN ont été visualisés par observation du gel sous rayonnements ultraviolets. La taille des fragments d'ADN a été estimée par comparaison de la distance de migration avec un marqueur de taille 100 pb (Promega, Madison, USA).

4.3.4. Electrophorèse capillaire

Un mélange contenant 18,75µL 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 1 µL de produit de PCR a été dénaturé pendant 5 min à 95°C puis refroidi immédiatement sur de la glace pour que les fragments 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 Biosystems, Foster City, USA) comme décrit par Duthoit *et al* (2003). L'électrophorèse capillaire sépare les brins d'ADN de taille identique selon leur séquence car les repliements des fragments d'ADN simple brin affectent leur vitesse de migration. Pour tous les profils SSCP, la proportion de chaque pic a été calculée selon la formule suivante : $P_i = a_i * 100 / \sum a_i$ où P_i est la proportion de chaque pic et a_i l'aire du pic.

4.3.5. Analyse des profils SSCP

Les pics des profils SSCP ont été assignés à des noms d'espèces en fonction de leur migration par comparaison aux profils de migration des souches de références et d'isolats identifiés.

La richesse et l'abondance des pics ont été évaluées par le calcul de l'indice de Shannon selon la formule suivante $H = - \sum (a_i / \sum a_i) * \ln (a_i / \sum a_i)$ où a_i est l'aire du pic. Plus le profil SSCP sera riche et plus la valeur de l'indice sera élevée.

Pour les croûtes des fromages aux communautés microbiennes reconstituées (cf. paragraphe 3.2.2) plus ou moins complexes, les pics des profils SSCP ont été assignés en comparant leur migration à celle des séquences nucléotidiques des souches utilisées pour reconstituer les communautés.

5. Analyses physico-chimiques et biochimiques

5.1. Mesures de pH

Les pH de surface des fromages ont été mesurés aux temps d'échantillonnage indiqués pour chaque essai. Les mesures ont été effectuées en 3 points de la croûte à l'aide d'un pH mètre 926VTV muni d'une électrode Ingold 406 MXP (Metter-Toledo, Viroflay, France). Les résultats présentés sont des moyennes des 3 points de mesures.

5.2. Mesures des extraits secs

Les teneurs en extraits secs des croûtes des fromages ont été déterminés selon la méthode de référence NVF 046282 (12/95).

5.3. Dosages des sucres et acides organiques des croûtes de fromages par méthode enzymatique.

Les acides lactiques L et D, acétique et formique ainsi que les sucres lactose, glucose et galactose ont été dosés par méthode enzymatique à l'aide de kits R-Biopharm selon les recommandations du fournisseur (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne). Les dosages enzymatiques ont été effectués sur le consortium complexe TR15, les culots et surnageants correspondants de l'essai 8 avant leur inoculation.

5.4. Dosages des sucres et acides organiques par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC en anglais)

5.4.1. Préparation des croûtes de fromages pour analyse par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC en anglais)

Les croûtes de fromages ont été finement broyées dans 20 mL d'eau distillée (10 g de croûte pour les acides et 10 g de croûte pour les sucres). Après incubation des suspensions de croûte pendant 1 h dans un bain-marie à 50°C, les suspensions ont été homogénéisées à l'aide de l'Ultra-Turrax type 125 (Grosseron S.A., Nantes, France) pendant 2 min à 9500 rpm. Comme décrit par Leclercq-Perlat *et al* (1999), pour l'extraction des acides organiques, 10 mL d'une solution d'acide trichloracétique à 24% ont été ajoutés au broyat de croûte puis laissés en contact pendant une heure à température ambiante. Les suspensions ont ensuite été pesées puis filtrées sur filtres sans cendres lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique (n°111, Durieux, Paris, France).

Pour l'extraction des sucres, 17 mL d'une solution de Carrez I (150 g/L d'hexacyanoferrate de potassium) et 17 mL d'une solution de Carrez II (300 g/L d'acétate de zinc) ont été ajoutées aux broyats de croûtes. Après homogénéisation par agitation manuelle, le mélange a été laissé en contact pendant une heure à température ambiante. Ensuite, 3,3 mL de NaOH (1N) ont été ajoutés. La suspension a été pesée puis filtrée sur filtres sans cendres lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique (n°111, Durieux, Paris, France).

5.4.2. Analyses HPLC

Les acides lactique, acétique, succinique, citrique, malique et formique ainsi que les sucres lactose, glucose et galactose ont été dosés par méthode HPLC.

Les analyses HPLC des échantillons issus des reconstitutions 2 et 3 ont été réalisées à l'unité de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (INRA, Thiverval-Grignon, France).

Le système HPLC (Waters, Guyancourt, France) était constitué d'un injecteur automatique, de deux détecteurs (un détecteur UV réglé à 210 nm pour les acides organiques et un réfractomètre différentiel pour les sucres) et 2 intégrateurs.

Les analyses HPLC des échantillons issus de la reconstitution 4 et des caractérisations des souches du consortium complexe TR15 ont été réalisées au sein de l'unité de Recherches Fromagères (INRA, Aurillac, France) pour le dosage des acides organiques et au sein de l'Institut Universitaire Technologique Biotechnologie (IUT, Aurillac, France) pour les sucres. Le système HPLC utilisé au sein de l'unité était constitué d'un injecteur automatique AS50 et d'un système de détecteur UV UVD170 (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). Le système HPLC disponible à l'IUT était composé d'un injecteur manuel et d'un réfractomètre (Waters, Guyancourt, France).

Pour tous les systèmes, la colonne échangeuse d'ions Aminex HPX-87H (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) a été maintenue à 35°C pendant toute la durée de l'analyse. De l'acide sulfurique (0,1 M) a été utilisé comme phase mobile à un débit de 0,6 mL/min. De l'acide propionique à 1% a été incorporé aux échantillons afin de servir de standard interne.

La présence des acides et des sucres dans les échantillons a été déterminée en comparant les temps de rétention des pics des molécules à ceux des molécules pures utilisées en standards. Les quantités d'acides et de sucres dans les échantillons ont été calculées par référence aux gammes étalons. Les sucres de la gamme étalon étaient le lactose, le glucose et le galactose. Les acides organiques de la gamme étalon étaient : l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide succinique, l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique et l'acide propionique.

6. Caractérisation des potentialités des souches issues de l'identification du consortium complexe TR15 à produire des acides *in vitro*

Cette expérimentation a été réalisée par Robert Didienne (INRA, Unité de Recherches fromagères) et Philippe Veisseire (IUT Biotechnologies, Aurillac).

6.1. Préparation du milieu fromager

La composition et les conditions de préparation du milieu fromager gélosé développé par Valérie Stahl et modifié par Robert Didienne est détaillé en Annexe 2.

Après dissolution des ingrédients le pH du milieu a été ajusté à 7,0 avec de l'acide chlorhydrique ou de la soude (1M) afin de favoriser la croissance des différentes souches. Le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 15 minutes. Avant utilisation les substrats à tester sont

ajoutés pour obtenir une concentration finale de 2 g/L soit 2 mL d'une solution à 10% pour 100 ml de milieu. Après mélange du substrat, le milieu a été coulé en boîtes de Petri à raison de 15 ml par boîte. Toutes les souches ont été pré-cultivées dans du bouillon caséine-soja incubé à 25°C jusqu'en fin de phase exponentielle avant inoculation.

Après refroidissement les boîtes ont été inoculées avec 10^4 UFC/g de gélose de la souche à tester.

Les milieux gélosés et ensemencés ont été incubés à 25°C, pendant un temps variable selon la souche inoculée. Les dénombrements des UFC et les mesures de pH ont ensuite été effectués.

6.2. Préparation des géloses Milieu fromager ensemencées avec les souches du consortium complexe TR15 pour analyse HPLC

Les analyses ont été réalisées sur la phase aqueuse, récoltée après centrifugation des géloses. Pour chaque souche testée, l'ensemble de la gélose ensemencée a été transférée dans un tube de centrifugation (2 boîtes de géloses ensemencées par tube soit environ 30 mL). Les échantillons ont ensuite été congelés à -20°C puis décongelés avant centrifugation. La congélation a permis d'obtenir un rendement de centrifugation 3 fois plus élevé par rapport à un échantillon non congelé. Les échantillons de géloses ensemencées ont ensuite été centrifugés à grande vitesse 41415 g pendant 15 min à 20°C (centrifugeuse Sigma 3K30, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Le surnageant généré a été prélevé immédiatement après centrifugation afin d'éviter la réabsorption du liquide par la gélose. Le pH a été mesuré sur ce surnageant. Les suspensions obtenues ont été directement analysées par HPLC comme décrit dans le paragraphe 5.4.2.

7. Analyse statistique

Le logiciel Statistica (Statsoft 2003, version 6.1, Tusa, USA) a été utilisé pour analyser statistiquement les données soit par analyse de variance soit par Analyse en Composantes Principales (ACP).

Groupe	Fromages essais	<i>L. monocytogenes</i> Log(UFC/cm ²)				pH	
		j1*	j8*	j18	j28	j18	j28
G1	TR26.3	<1	<1	1,6	2,8	7,25	7,95
	TR19.3	<1	<1	2,5	3,7	7,30	7,85
	TR11	<1	<1	3,2	4,0	7,15	8,04
	TR15	1,5	<1	3,3	4,0	6,42	7,12
	Contrôle.3	<1	<1	2,8	4,0	7,51	7,32
	TR15.1.2	<1	1,5	3,3	4,1	7,17	7,83
	TR26	<1	<1	3,3	4,1	6,72	6,75
	TR15.1.3	<1	<1	2,5	4,2	7,13	8,57
	TR15.3	<1	<1	2,8	4,3	7,63	8,02
	TR26.2	<1	<1	3,0	4,7	7,33	8,64
	TR24.1.3	<1	<1	4,1	4,7	7,55	8,58
	TR19	<1	<1	4,2	4,8	7,11	7,21
	TR13	<1	1,8	4,0	4,9	7,10	6,84
	TR11.1.3	<1	<1	3,8	4,9	8,05	8,55
	TR11.2	<1	<1	3,2	4,9	7,52	8,28
	TR9	<1	1,5	3,5	4,9	6,41	6,20
	TR22	<1	2,0	3,7	4,9	6,74	6,73
	TR15.2	<1	<1	3,7	4,9	7,96	8,64
	TR19.1.3	<1	<1	3,2	5,0	7,25	9,03
	TR30	1,8	1,8	3,8	5,0	6,60	7,15
TR19.1.2	<1	<1	4,2	5,0	7,23	7,45	
TR24	1,5	<1	3,2	5,0	6,63	6,93	
TR24.1.2	<1	1,5	3,6	5,0	7,18	7,58	
TR25	<1	1,5	4,2	5,0	7,41	8,47	
G2	TR26.1.2	<1	<1	2,9	5,1	6,98	7,59
	TR19.2	1,5	<1	4,1	5,1	7,48	8,23
	TR11.1.2	<1	<1	4,3	5,2	7,37	7,55
	Contrôle.1.3	<1	<1	3,9	5,3	7,59	8,41
	Contôle.2	<1	<1	3,9	5,3	7,59	8,41
	TR23	<1	2,0	4,3	5,3	7,10	5,94
	TR12	<1	1,5	4,4	5,3	7,47	8,00
	TR29	<1	1,5	3,5	5,3	6,35	7,00
	TR26.1.3	<1	2,1	3,4	5,3	7,48	8,27
	TR6	<1	<1	4,4	5,3	7,17	8,18
	TR8	<1	<1	4,2	5,4	7,14	8,06
	TR34	<1	1,5	4,0	5,4	6,98	6,70
	TR20	1,5	2,0	4,5	5,5	6,92	6,10
	TR24.2	<1	<1	4,1	5,5	7,78	8,36
	TR28	2,0	<1	4,2	5,5	7,34	8,26
	TR16	<1	2,4	3,9	5,6	7,05	8,21
	TR32	1,5	2,1	4,7	5,7	6,28	6,85
	TR2	<1	<1	4,5	5,7	7,34	7,85
TR17	1,5	1,8	3,8	5,7	6,48	6,87	
G3	TR1	1,8	<1	4,1	5,9	6,21	7,03
	TR31	2,5	2,9	4,5	6,0	7,05	7,96
	TR35	<1	<1	4,3	6,0	6,97	7,06
	TR27	<1	<1	4,1	6,0	6,31	6,95
	TR3	1,5	<1	4,3	6,1	7,14	6,82
	Contrôle.1.2	<1	1,5	4,2	6,1	6,67	7,61
	TR14	<1	2,1	4,0	6,1	6,93	5,80
	Contrôle	1,5	<1	4,4	6,2	7,52	6,70
	TR33	<1	<1	4,2	6,2	7,14	5,96
	TR18	<1	<1	4,9	6,3	7,07	7,66
	TR10	2,0	2,3	5,4	6,3	6,42	6,97
	TR5	1,5	<1	4,3	6,4	6,45	6,94
	TR4	<1	<1	4,7	6,4	6,67	5,91
	TR7	<1	1,8	5,3	6,4	6,35	6,95

Tableau 8 : Croissance de *Listeria monocytogenes* et pH durant l'affinage à la surface des fromages inoculés avec les 34 consortiums

*A 1 et 8 jours d'affinage, niveaux de *L. monocytogenes* en dessous du seuil de détection de 1 Log UFC/cm² et sont indiquées par <1.

Croûtes des fromages inoculées avec TRx = consortium complexe préparé comme indiqué dans le paragraphe 2.1.1 dans la partie Matériels et Méthodes. TRx.1.2 = consortium issu de croûtes de fromage de la 1^{ère} campagne de collecte et après 3 mois de stockage à -20°C, TRx.1.3 = consortium issu de croûte de fromage de la 1^{ère} campagne de collecte et après 4 mois de stockage à -20°C, TRx. 2 = consortium issu de croûte de fromages AOC St Nectaire collectés chez les mêmes affineurs lors de la 2nd campagne de collecte, TRx.3 = consortium issu de croûte de fromages AOC St Nectaire collectés chez les mêmes affineurs lors de la 3^{ème} campagne de collecte.

Indiqués en gras, les 5 consortiums sélectionnés après la 1^{ère} campagne. Surligné en bleu, le consortium TR15, le plus inhibiteur au cours du temps.

RESULTATS

1. Propriétés anti-listeria de consortiums complexes issus de croûtes de fromages fermiers St Nectaire

1.1. Capacités inhibitrices des consortiums complexes

L'objectif de cette première partie était d'évaluer la capacité de consortiums microbiens issus de croûtes de fromages AOC St Nectaire fermiers à inhiber la croissance de *L. monocytogenes* à la surface de fromages à pâte pressée non cuite.

Ainsi 34 consortiums préparés à partir de croûtes de fromages St Nectaire fermiers ont été testés à la surface de fromages à pâte pressée non cuite au lait pasteurisé.

Ces résultats ont été intégrés dans la publication : *Is microbial diversity an asset for inhibiting Listeria monocytogenes in raw milk cheeses ?* acceptée dans Dairy Science and Technology dont le texte intégral figure page 167.

Les niveaux de *L. monocytogenes* sur les surfaces des fromages inoculés avec 34 consortiums microbiens complexes de croûtes de fromages Saint-Nectaire fermiers (TR1 à TR20 et TR22 à TR34) et ceux de fromages contrôle inoculés uniquement avec un ferment commercial d'affinage, après différents temps d'affinage à 9°C, sont donnés dans le tableau 16.

Quels que soient les consortiums de croûtes de fromages, *L. monocytogenes* ne se multiplie pas sur la surface des fromages durant les huit premiers jours d'affinage. Malgré un ensemencement de 2-5 UFC/cm², son niveau à 8 jours est inférieur au seuil de détection de 10 UFC/cm². *L. monocytogenes* se développe principalement entre 8 et 18 jours d'affinage pour atteindre un niveau maximal à 28 jours. Sur la base du niveau de *L. monocytogenes* à 28 jours les fromages ensemencés avec les différents consortiums de croûte peuvent être classés en trois groupes. Le groupe 1 (23 consortiums) regroupe les fromages avec le niveau le plus bas de *L. monocytogenes* à 28 jours (entre 2,8 et 5 Log UFC/cm²). Les fromages du groupe 2 (17 consortiums) ont un niveau de *L. monocytogenes* en surface variant entre 5,1 et 5,7 Log UFC/cm². Le groupe 3 (14 consortiums) ont des niveaux supérieurs à 5,9 Log UFC/cm². Les fromages contrôle inoculés uniquement avec *Penicillium commune* (ferment de surface commercial) se classent dans les groupes 2 et 3 excepté le contrôle.3 classé dans le groupe 1. La stabilité des propriétés anti-listeria de 5 consortiums TR11, TR15, TR19, TR26 et TR24 parmi les plus inhibiteurs de la première campagne de prélèvement a été évaluée après 3 et 4 mois de stockage à -20°C. Les capacités inhibitrices des consortiums TR15 (TR15.1.2 et TR15.1.3) et TR24 (TR24.1.2 et TR24.1.3) ne sont pas affectées par le stockage à -20°C et le

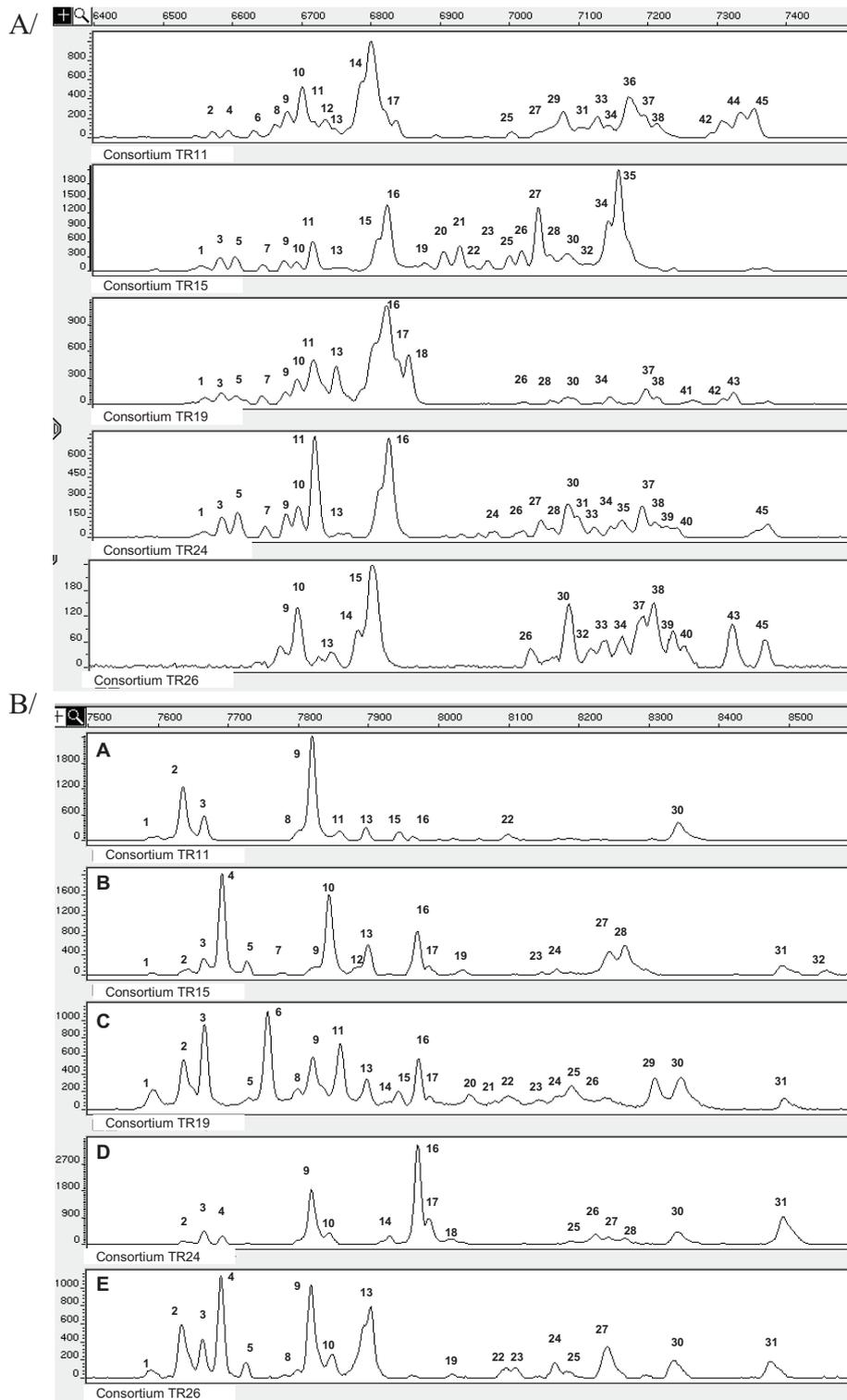


Figure 5 : Comparaison des profils microbiens des 5 consortiums de croûtes de fromages présentant des propriétés anti-listeria par analyse SSCP des régions V3 et V2 des ADNr 16S

Analyse SSCP des produits d'amplification de la région V3 des ADNr 16S (A) et d'une partie de la région V2 (B) des ADNr 16S totaux extraits à partir des croûtes de fromages des 5 consortiums. Chaque profil représente un ensemble de pics séparés en fonction des Scan, et présentant une intensité de fluorescence (en ordonnée). A = profil du consortium TR11, B = profil du consortium TR15, C = profil du consortium TR19, C = profil du consortium TR19, D = profil du consortium TR24 et E = profil du consortium TR26. Les pics ont été numérotés selon leur ordre d'éluion. Les pics communs aux différents profils sont indiqués par les mêmes numéros.

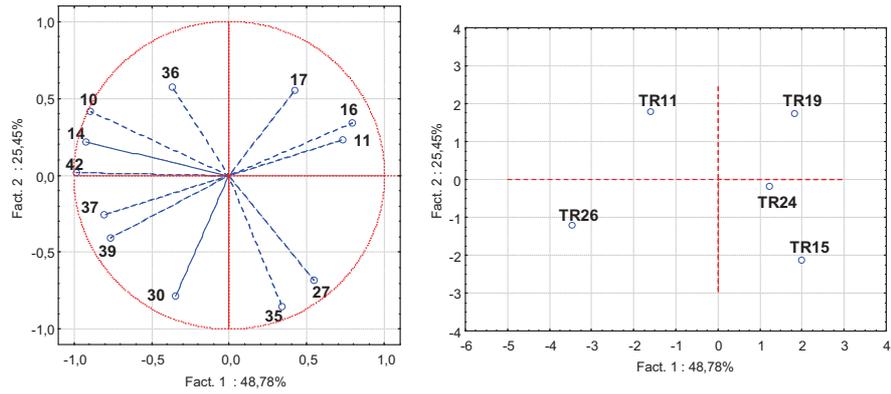
consortium TR15 est toujours le plus inhibiteur. En revanche, les consortiums TR11, TR19 et TR26, perdent en partie leur capacité inhibitrice dès 3 mois de stockage.

Après 4 mois de stockage, TR26 n'est plus inhibiteur (TR26.1.2 et TR26.1.3 dans le groupe 2) tandis que les consortiums TR11 et TR19 inhibent de façon équivalente au troisième mois de stockage. Ces variations de croissance pourraient être attribuées à un manque de reproductibilité de la méthode d'ensemencement, à la modification des équilibres microbiens durant le stockage et à une dynamique des populations différentes d'une expérimentation à l'autre.

La stabilité des propriétés anti-listeria de 3 consortiums TR15, TR19 et TR26 à l'échelle de la transformation fromagère et de l'affinage a également été évaluée. Ainsi, 4 et 12 mois après la première campagne de collecte, des fromages préparés par les mêmes producteurs et affinés par les mêmes affineurs ont été prélevés et leurs consortiums de croûte étudiés comme dans la première campagne. Les consortiums TR15, TR19 et TR26 de la seconde campagne de collecte (TR15.2, TR19.2, TR26.2) sont moins inhibiteurs que ceux préparés avec les fromages de la première campagne. Les consortiums TR15.2 et TR26.2 sont toujours classés dans le groupe 1 tandis que TR19.2 se situe dans le groupe 2. Deux des 3 consortiums de la 3^{ème} campagne de collecte (TR19.3 et TR26.3) sont eux plus inhibiteurs que ceux de la première et se retrouvent dans le groupe 1, tandis que le troisième consortium TR15.3 est toujours aussi inhibiteur. Ces résultats indiquent qu'il existe à la fois une variabilité des propriétés inhibitrices à l'échelle de la transformation fromagère et de l'affinage. Dans tous les fromages, le pH augmente tout au long de l'affinage, les valeurs moyennes de 7,06 à 18 jours atteignent 7,47 à 28 jours et pourraient favoriser la croissance de *L. monocytogenes*. Le niveau de *L. monocytogenes* à un temps d'affinage donné n'est que faiblement corrélé négativement aux valeurs de pH, $r = -0,22$ à 18 jours (pH variant entre 6,21 et 8,05, $n = 56$) et $r = -0,38$ à 28 jours (pH variant entre 5,8 et 9,03, $n = 56$).

En conclusion, certains consortiums tel que le TR15 peuvent être conservés à -20°C sans diminuer leurs propriétés inhibitrices. Par contre, les consortiums des croûtes des fromages fabriqués par le même producteur et affinés par le même affineur n'ont pas toujours les mêmes capacités inhibitrices.

A/



B/

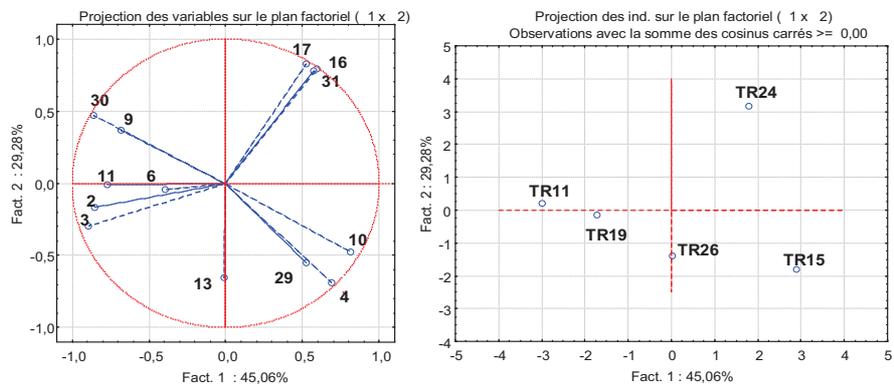


Figure 6 : Analyse en Composante principale des proportions des pics dominants des profils SSCP des régions V3 et V2 des ADNr 16S.

A/ région V3 des ADNr 16S ; B/ région V2 des ADNr 16S

1.2. Comparaison des profils bactériens des 5 consortiums inhibiteurs sélectionnés

Les profils bactériens SSCP des 5 consortiums microbiens (suspensions des croûtes des fromages St Nectaire fermiers) les plus inhibiteurs inoculés à la surface des fromages de la première campagne ont été comparés afin d'évaluer si l'inhibition pouvait être associée à un type de profil ou à la présence de certains pics selon l'approche décrite par Saubusse *et al*, (2007). Ainsi, la région V3 et une partie de la région V2 de l'ADNr 16S pour cibler les espèces bactériennes à Gram positif, ont été analysées. Les profils SSCP V3, V2 de la figure 5 A et B illustrent la diversité de profils de ces 5 consortiums. Ils diffèrent par l'indice de Shannon qui traduit la richesse et l'abondance des pics. Ainsi le profil V3 du consortium TR15 a l'indice de Shannon le plus élevé ($H = 2,70$) alors que celui du consortium TR19 est le plus faible ($H = 2,24$). Par contre, pour les profils de la région V2 ciblant les espèces de bactéries à Gram positif, le profil du consortium TR19 avec un indice de Shannon de 2,88 est le plus riche. Le consortium TR11 apparaît comme le moins divers en bactéries à Gram positif ($H = 1,9$ et 12 pics) tandis que le consortium TR15 a une richesse intermédiaire.

Les profils bactériens SSCP des consortiums peuvent aussi être caractérisés par la proportion de chaque pic sur le profil. Certains pics ont été identifiés sur la base des données des profils SSCP de souches identifiées à partir du consortium complexe TR15, et des souches et clones du laboratoire mais leur identification reste à confirmer. L'Analyse en Composante Principale des proportions des pics dominants dans les profils SSCP des régions V3 et V2 des ADNr 16S discrimine les consortiums comme indiqué dans la figure 6 A et B. Le consortium TR15 est caractérisé par la dominance dans son profil SSCP de la région V3 de deux pics 27 (*Enterococcus* et *Serratia*) et 35 (*Lactobacillus* et *Leuconostoc*) dont la superficie représente 32% du profil et le consortium TR24 se distingue par 2 pics 11 (*Arthrobacter*) et 16 (inconnu) dont la superficie représente 42% du profil. Trois pics (11, 16 et 17 - 65% du profil) caractérisent le consortium TR19 alors que le pic 14 (*Psychrobacter*) domine dans les consortiums TR11 et TR26 (Fig. 6A). De la même façon, les consortiums se distinguent les uns des autres par la dominance de certains pics dans leurs profils SSCP de la région V2. Ainsi, le consortium TR15 est défini par la dominance de 3 pics, 4 (*Leucobacter*), 10 (*Arthrobacter*) et 29 représentant 52% du profil. Le pic 9 (*Leuconostoc*) est commun à tous les consortiums TR11 (37%), TR15 (2%), TR19 (9%), TR24 (18%) et TR26 (16%). Comme précisé précédemment, le consortium TR19 est caractérisé par le profil le plus riche en bactéries à Gram positif dominé par 7 pics dont : 2 (*Arthrobacter*), 3 (*Brevibacterium*), 6, 11, 29 et 30 (Fig. 6B).

En conclusion, même si ces consortiums ont en commun des capacités à limiter la croissance de *Listeria* en fromages, leur profils bactériens obtenus par la technique SSCP sont différents et dominés par seulement quelques espèces identifiées. Leur analyse n'a pas permis de dégager des hypothèses sur des populations impliquées dans l'inhibition. Aussi, nous avons choisi de focaliser la suite du travail sur l'étude des propriétés inhibitrices d'un seul consortium. Le consortium TR15 a été choisi en raison de sa plus grande capacité inhibitrice lors de la première campagne de prélèvement et de sa stabilité lors du stockage à -20°C.

A/ Aires d'inhibition	AI (1-5)	AI (8-5)	AI (11-8)	AI (14-11)	AI (18-14)	AI (21-18)	AI (25-21)	Σ AI
TR15 + List 5 UFC/cm ²	2,72	1,32	0,00	1,03	2,99	4,61	7,52	20,21
TR15 + List 50 UFC/cm ²	0,17	0,14	0,25	-0,93	-0,58	2,12	5,06	6,23

B/ pH	pH 1	pH 5	pH 8	pH 11	pH 14	pH 18	pH 21	pH 25
Contrôle + List 5 UFC/cm ²	5,11	5,10	5,58	6,99	7,27	7,69	7,82	7,75
TR15 + List 5 UFC/cm ²	5,11	5,18	5,90	7,08	7,11	7,79	8,32	7,87
Contrôle + List 50 UFC/cm ²	5,25	5,11	5,81	6,65	7,19	7,84	7,79	8,01
TR15 + List 50 UFC/cm ²	5,56	5,45	6,65	7,30	7,14	7,45	7,99	7,99

Tableau 17 : Aires d'inhibition de *Listeria monocytogenes* et pH à la surface des fromages inoculés avec le consortium TR15 et 2 niveaux de *L. monocytogenes*.

A/ Aires d'inhibition : AI = aires d'inhibition calculées entre 2 jours d'affinage (t2-t1) selon la formule $AI = (t2-t1)/2 * [(Ct2+Ct1)-(Tt2-Tt1)]$ avec C = valeur de dénombrement de *L. monocytogenes* à la surface du fromage contrôle, et T = valeur de dénombrement de *L. monocytogenes* à la surface des fromages inoculés avec le consortium. TR15 = consortium issu de croûte de St Nectaire de la 1^{ère} campagne de collecte et après conservation à -20°C, Contrôle = ferment commercial (*Penicillium commune*). List = inoculum de *L. monocytogenes* de 5 ou 50 UFC/cm².

B/ pH : Moyennes de 3 points de mesures de pH sur la croûte à 1, 5, 8, 11, 14, 18, 21 et 25 jours d'affinage. L'écart type sur la mesure est <0,05.

A/ Aires d'inhibition	AI (8-1)	AI (18-8)	AI (28-18)	ΣAI
TR15	-1,14	1,65	9,73	10,24
pTR15-8	0,00	10,48	15,46	25,95
pTR15-15	0,00	4,07	6,72	10,80
pTR15-18	-0,29	6,01	9,63	15,35
pTR15-28	-0,91	3,89	5,72	8,70

B/pH	pH 1	pH 8	pH 18	pH 28
Contrôle	5,46	6,06	8,01	7,47
TR15	5,15	5,89	7,13	7,54
pTR15-8	5,12	6,07	6,96	7,69
pTR15-15	5,21	6,00	7,30	7,55
pTR15-18	5,09	6,1	7,32	7,80
pTR15-28	5,10	6,49	7,00	7,56

Tableau 18 : Aires d'inhibition de *Listeria monocytogenes* et pH à la surface des fromages inoculés avec des consortiums TR15 propagés plusieurs jours à la surface de fromages.

A / Aires d'inhibition : AI = aires d'inhibition calculées entre 2 jours d'affinage (t2-t1) selon la formule $AI = (t2-t1)/2 * [(Ct2+Ct1)-(Tt2-Tt1)]$ avec C = valeur de dénombrement de *L. monocytogenes* à la surface du fromage contrôle, et T = valeur de dénombrement de *L. monocytogenes* à la surface des fromages inoculés avec le consortium. TR15 = consortium issu de croûte de fromage St Nectaire de la 1^{ère} campagne de collecte. pTR15-x = consortium TR15 propagé puis récolté après 8, 15, 18 ou 28 jours comme décrit paragraphe 2.1.2 de la partie Matériels et Méthodes

B / pH : Moyennes de 3 points de mesures de pH sur la croûte à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage. L'écart type sur la mesure est <0,1 unité de pH.

2. Propriétés anti-listéria du consortium complexe TR15

2.1. Incidence du taux d'inoculum de *L. monocytogenes* sur son inhibition par le consortium TR15.

L'effet de deux niveaux d'inoculation de *L. monocytogenes* sur les propriétés inhibitrices du consortium TR15 a été testé.

L'effet de la taille de l'inoculum de *L. monocytogenes* 5 ou 50 UFC/cm² sur les propriétés anti-listeria du consortium TR15, appréciées par le calcul des aires d'inhibition (AI) est indiqué dans le tableau 17. Pour un inoculum de 5 UFC/cm², *L. monocytogenes* est inhibée par le consortium TR15 dès 5 jours alors qu'avec un inoculum de 50 UFC/cm², l'inhibition ne débute qu'à 18 jours. De 18 à 25 jours d'affinage, l'inhibition par le consortium TR15 est assez similaire que *L. monocytogenes* soit inoculée à 5 ou 50 UFC/cm².

Ce retard dans l'inhibition avec un inoculum de *L. monocytogenes* à 50 UFC/cm² pourrait s'expliquer par des valeurs de pH plus élevées sur ces fromages entre 1 et 11 jours ; Cependant, il est difficile d'imputer l'augmentation du pH au niveau d'inoculation de *L. monocytogenes* vu que les pH des contrôles sont assez similaires quel que soit le niveau d'inoculum de *L. monocytogenes* (cf. tableau 17 B).

Ces résultats nous ont conduits à choisir un niveau d'inoculum de *L. monocytogenes* de 5 UFC/cm² pour les expérimentations, plus proche des niveaux de contamination de croûtes de fromages naturellement contaminées.

2.2. Propagation du TR15 à la surface de fromages

Dans une perspective d'application industrielle qui était une des finalités de ce travail dans le cadre du projet Truefood dans lequel cette thèse s'est déroulée, la possibilité de propager le consortium inhibiteur TR15 sur croûte de fromage a été étudiée. Dans cette optique, ce consortium a étéensemencé sur des croûtes de fromages modèles et des consortiums issus de ces croûtes à différents temps d'affinage ont été préparés selon le protocole précisé dans le paragraphe 2.1.2 de la partie Matériels et Méthodes. Leur capacité inhibitrice a été évaluée sur croûte de fromage selon la même méthodologie que celle appliquée dans l'étape de criblage.

Le consortium issu de croûte de fromage TR15 âgée de 8 jours (pTR15-8) est plus inhibiteur du développement de *L. monocytogenes* à la surface des fromages ($\Sigma AI = 25,95$) que les consortiums préparés avec des croûtes affinées plus longtemps (Tableau 18 A). En effet les sommes des AI sont de 10,80 pour des croûtes âgées de 15 jours (pTR15-15), de 15,35 pour des croûtes de 18 jours (pTR15-18) et seulement de 8,70 pour des croûtes âgées de

A/ Aires d'inhibition	AI (8-1)	AI (18-8)	AI (28-18)	ΣAI
TR15	8,55	21,10	20,74	50,39
TR15-C1	3,94	16,78	22,90	43,62
TR15-C2	8,44	25,34	27,21	60,99
TR15-S1	1,67	5,26	7,15	14,08
TR15-S2	0,55	0,79	3,33	4,68

B/ pH	pH 1	pH 8	pH 18	pH 28
Contrôle	5,32	5,87	7,57	7,89
TR15	5,75	6,22	7,87	7,98
TR15-C1	5,64	6,64	7,77	7,86
TR15-C2	5,35	6,7	7,81	8,18
TR15-S1	5,66	7,07	7,25	7,91
TR15-S2	5,59	7,86	7,51	8,15

Tableau 19 : Aires d'inhibitions de *L. monocytogenes* et pH à la surface des fromages inoculés avec les culots ou surnageants issus du consortium TR15.

A/ Aires d'inhibition : AI = aires d'inhibition. $AI = (t_2 - t_1) / 2 * [(C_{t_2} + C_{t_1}) - (T_{t_2} + T_{t_1})]$ avec C = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages contrôle et T = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages inoculés avec les différents consortiums, $(t_2 - t_1)$ = les temps d'affinage. Surfaces des fromages inoculés avec les différents consortiums : TR15 = consortium complexe ; TR15-C1 = consortium complexe TR15 après 1 lavage du culot microbien, TR15-C2 = consortium complexe TR15 après 2 lavages du culot microbien, TR15-S1 = surnageant du 1^{er} lavage du consortium complexe TR15, TR15-S2 = surnageant du 2nd lavage du consortium complexe TR15.

B/ pH : Moyenne de 3 points de mesure sur la croûte des fromages à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage. L'écart type sur la mesure est <0,15 unité de pH.

	TR15	TR15-C1	TR15-C2	TR15-S1	TR15-S2
D. acide lactique (µg/cm ²)	1,14	0,082	0,052	0,83	0,05
L. acide lactique (µg/cm ²)	2,93	0,35	0,26	1,69	0
acide acétique (µg/cm ²)	0,78	0,11	0,090	0,33	0,060

Tableau 20 : Quantités en acides organiques inoculées à la surface des fromages

Dosages des acides organiques réalisés par méthode enzymatique comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Résultats exprimés en µg/cm². Surfaces des fromages inoculées avec les différents consortiums : TR15 = consortium complexe ; TR15-C1 = consortium complexe TR15 après 1 lavage du culot microbien, TR15-C2 = consortium complexe TR15 après 2 lavages du culot microbien, TR15-S1 = surnageant du 1^{er} lavage du consortium complexe TR15, TR15-S2 = surnageant du 2nd lavage du consortium complexe TR15

28 jours. Le consortium pTR15-18, propagé 18 jours a une capacité inhibitrice similaire au consortium TR15 initial également récolté après 18 jours d'affinage ($\Sigma AI = 20,21$) (Tableaux 17 et 18).

Les pHs en surface des fromagesensemencés avec le consortium TR15 d'origine et tous les consortiums pTR15-8, pTR15-15, pTR15-18 évoluent de façon similaire. Le pH augmente au cours de l'affinage d'une valeur de 5,09 à 5,15 à 1 jour pour atteindre des valeurs comprises entre 7,54 et 7,80 à 28 jours d'affinage. Le pH des croûtes des fromages pTR15-28 évolue différemment avec une plus forte augmentation entre 1 et 8 jours (de 5,10 à 6,49). Cette plus forte augmentation du pH entre 1 et 8 jours pourrait expliquer le plus faible pouvoir inhibiteur du consortium pTR15-28 en début d'affinage (Tableau 18B). Elle pourrait être attribuée à une dominance des bactéries d'affinage par rapport aux bactéries lactiques sur ces croûtes à 28 jours. De même, la dynamique des flores entre 1 et 8 jours pourrait également expliquer que le consortium pTR15-8 soit le plus inhibiteur mais elle n'a pas été analysée.

En conclusion il serait donc possible de propager le consortium TR15 en surface de fromages et de bénéficier de plus grandes capacités inhibitrices en le récoltant à 8 jours. Cependant, nous avons choisi de poursuivre l'étude du consortium TR15 initial récolté sur des croûtes de 18 jours et conservé à -20°C en raison de la stabilité de ses propriétés inhibitrices lors de la conservation à -20°C .

A ce stade de l'étude, nous avons formulé deux hypothèses sur la nature de l'inhibition par les consortiums. La première hypothèse associe l'inhibition à la présence de substances inhibitrices dans ces consortiums provenant de la surface des fromages et non éliminées par leur préparation tel que décrit dans le paragraphe 2.1.3 et la figure 4 de la partie Matériels et Méthodes. La seconde hypothèse serait que l'inhibition découle de la dynamique, en cours d'affinage, des populations microbiennes composant le consortium TR15.

2.3. Propriétés anti-listeria de la fraction biochimique soluble du consortium microbien TR15 et des culots microbiens correspondants

Pour vérifier la première hypothèse nous avons déterminé les propriétés anti-listeria des culots microbiens (C1 et C2) et surnageants de la suspension de croûte TR15 (S1 et S2) (Figure 4) préparés comme décrit dans le paragraphe 2.1.3 de la partie Matériels et Méthodes. Parallèlement, les acides ont été dosés dans les différentes fractions. L'évaluation des capacités inhibitrices des surnageants (TR15-S1, TR15-S2) et culots microbiens (TR15-C1 et TR15-C2) par calcul des AI est résumée dans le Tableau 19.

	Contrôle	TR15	TR15-C1	TR15-C2	TR15-S1	TR15-S2
Lactobacilli	<2	4,9	5,0	4,9	3,6	3,0
Leuconostocs D+	<2	4,7	4,8	4,7	3,3	3,0
Enterococci	<2	3,7	3,9	3,7	3,0	<2
CRBM	<2	5,2	5,4	5,0	3,1	3,0
Staphylococci	<2	2,7	2,3	<2	<2	<2
Bactéries à Gram négatif	<2	2,0	2,3	2,0	<2	<2
Levures	<2	3,1	2,3	3,0	<2	<2
Moisissures	<2	4,1	4,1	4,6	4,0	4,1

Tableau 21 : Dénombrements des flores microbiennes à la surface des fromages inoculés avec les culots et surnageants issus du consortium TR15

Résultats des dénombrements des flores microbiennes sur les divers milieux sélectifs exprimés en log UFC/cm². Les valeurs <2 indiquent les dénombrements en dessous de la limite de détection de 2 log UFC/cm². Surfaces des fromages inoculées avec les différents consortiums : TR15 = consortium complexe ; TR15-C1 = consortium complexe TR15 après 1 lavage du culot microbien, TR15-C2 = consortium complexe TR15 après 2 lavages du culot microbien, TR15-S1 = surnageant du 1^{er} lavage du consortium complexe TR15, TR15-S2 = surnageant du 2nd lavage du consortium complexe TR15

Le surnageant TR15-S1 n'inhibe que faiblement *L. monocytogenes* en fin d'affinage (AI (28-18) = 7,15) tandis que le surnageant TR15-S2 n'est pas inhibiteur. Par contre, les deux culots microbiens ont des niveaux d'inhibition similaires au TR15 initial dès le début d'affinage avec des AI entre 1 et 8 jours variant entre 3,94 et 8,44 et une inhibition se maintenant tout au long de l'affinage. Globalement le consortium TR15-C2 serait plus inhibiteur (Σ AI = 60,99) que le consortium TR15 initial (Σ AI = 50,39), ou TR15-C1 (Σ AI = 43,62).

L'inhibition dans les surnageants ou les culots ne peut être attribuée à la présence d'acides puisque d'après les quantités d'acides lactique ou acétique dosées dans les différentes fractions, l'apport d'acides par inoculation est très faible. En effet, 2,52 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'acide lactique D et L et 0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'acide acétique sont apportés en surface par l'inoculation de TR15-S1 tandis que des concentrations inférieures à 0,06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour le surnageant TR15-S2. L'apport d'acides organique est inférieur à 0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ par inoculation des culots TR15-C1 et TR15-C2 (Tableau 20).

Les valeurs de pH n'expliquent pas l'inhibition puisque les fromages contrôles ont les niveaux les plus élevés en *L. monocytogenes* et les valeurs de pH les plus faibles à 1 et 8 jours. De plus, les croûtes de fromage inoculées avec le consortium TR15-C2, le plus inhibiteur ont les valeurs de pH les plus élevées en fin d'affinage (Tableau 19 A et B). Dans le cas des consortiums TR15-S1 et TR15-S2 les plus fortes augmentations de pH sont observées entre 1 et 8 jours et pourraient expliquer leur plus faible inhibition.

Les inhibitions par les différentes fractions seraient plutôt associées à leurs flores microbiennes. La plus forte inhibition est associée aux culots TR15-C1 et TR15-C2 qui présentent les niveaux des principaux groupes microbiens les plus élevés (bactéries lactiques entre 3,9 et 5 log UFC/cm², bactéries Gram positif et catalase positive > 5 log UFC/cm²), similaires à ceux du consortium initial (Tableau 21). Les surnageants S1 et S2 des consortiums - TR15-S1, TR15-S2 contenaient également des bactéries lactiques (3 log UFC/cm²), des bactéries à Gram positif et catalase positive (3 log UFC/cm²) et des spores de moisissures (4 log UFC/cm²) mais les niveaux de bactéries à Gram négatif et levures étaient inférieurs à 2 log UFC/cm² (Tableau 21).

Ces résultats suggèrent que la communauté microbienne du consortium complexe TR15 jouerait un rôle dans l'inhibition. C'est pourquoi, l'étude s'est orientée vers l'identification des populations de cette communauté, qui pourraient être impliquées dans l'inhibition.

Pour ce faire une collection de souches a été constituée en sélectionnant des souches à différents stades d'affinage afin de privilégier les espèces se développant durant l'affinage.

Tableau 22 : Identification phylogénétique des isolats du consortium complexe TR15

Milieu de culture d'origine	Groupe RFLP ¹	Nombre d'isolats	Amplification PCR spécifiques des espèces de bactéries lactiques ²							Nombre d'isolats séquencés	Séquences d'ADNr 16S et 26S (> 99% homologie)
(a) Bactérie											
			paracasei	Lpl	Lc	Lmn1	Lncit1	ddlE1	ddlF1		
FH, CRBM	G1	16	+	-	-	-	-	-	-	2	Gram+ Catalase -
			-	-	+	-	-	-	-	2	2 <i>Lactobacillus casei</i> 2 <i>Lactobacillus curvatus</i>
MSE, FH, CRBM (j11, j18, j21, j28)	G2	12	-	-	-	+	-	-	-	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
SB, CRBM (j21, j28)	G3	11	-	-	-	-	-	+	-	1	<i>Enterococcus faecalis</i>
CRBM (j21, j28)	G4	2	-	-	-	-	-	-	-	2	<i>Carnobacterium mobile</i>
CRBM (j21, j28)	G5	5	-	-	-	-	-	-	-	5	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>
CRBM (j21, j28)	G6	13								7	Gram+ Catalase + 1 <i>Arthrobacter nicotianae</i> - <i>arilaitensis</i> 6 <i>Arthrobacter ardleyensis</i> - <i>bergerei</i> 2 <i>Brevibacterium linens</i> - <i>casei</i> 1 <i>Brevibacterium casei</i> - <i>antiquum</i> (97% homologie)
CRBM (j21, j28)	G7	4								3	1 <i>Brachybacterium sp.</i> 3 <i>Staphylococcus pulvereri</i> 1 <i>Staphylococcus xylosus</i>
CRBM (j21, j28)	G8	1								1	Gram- <i>Pseudomonas fluorescens</i> - <i>syringae</i> <i>Serratia</i>
CRBM, RPF (j18, j21, j28)	G10	4								4	2 <i>proteomaculans</i> - <i>liquefaciens</i> 4 <i>Proteus vulgaris</i>
PCA+M+CV, CFC, RPF (j18, j21, j28)	G11	17								3	
PCA+M+CV (j18)	G12	2								2	
RPF (j18, j21)	G9	8								4	
(b) Levures											
			Identification phénotypique³								
OGA (j18)		11	<i>Candida sake/tropicalis</i>							2	<i>Candida sake</i>
OGA (j18)		2	<i>Yarrowia lipolytica</i>							2	<i>Yarrowia lipolytica</i>
OGA (j18)		3	<i>Debaryomyces hansenii</i>							3	<i>Debaryomyces hansenii</i>
			Identification microscopique								
OGA (j18)		1	<i>Geotrichum sp.</i>								
OGA (j18)		1	<i>Penicillium blanc</i>								
OGA (j18)		1	<i>Mucor sp.</i> (poils ras)								
OGA (j18)		1	<i>Mucor sp.</i> (poils longs)								
Nombre total d'isolat		115								46	

(a) Identification des bactéries : analyse RFLP et séquençage des ADNr 16S, (b) Identification des levures : identification phénotypique et séquençage de l'ADNr 26S. Entre parenthèses () sont indiqués les jours de prélèvement des croûtes pour lesquels ont été trouvés les isolats. Les détails sur les milieux de culture sont détaillés dans le Matériels et Méthodes.

¹ Profils RFLP analysés à l'aide du logiciel Bionumerics par méthode UPGMA. Les isolats présentant des profils identiques ont été rassemblés dans un même groupe et les ADNr 16S ou 26S d'un ou plusieurs isolats ont été séquencés. ² La description des amorces est donnée dans le Matériels et Méthodes; ³ Identification phénotypique suivant les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Assignation à un nom d'espèce selon la clé dichotomique de Barnett and Payne.

3. Identification des populations microbiennes du consortium complexe TR15

3.1. Identification des microorganismes capables de se développer à la surface des fromages.

Les isolats bactériens, les levures et moisissures capables de se développer à la surface des fromages inoculés avec le consortium TR15 ont été identifiés par RFLP, par amplification PCR avec des amorces spécifiques (cf. Tableau 12), par séquençage de l'ADNr 16S pour les bactéries et par séquençage de l'ADNr 26S pour les levures comme décrit dans le paragraphe 2.2.2 de la partie Matériels et Méthodes. L'affiliation phylogénétique des 95 isolats bactériens et des 16 levures est indiquée dans le Tableau 22 et est incluse dans l'article inclus page 167 : *Is microbial diversity an asset for inhibiting Listeria monocytogenes in raw milk cheeses ?* dans Dairy Science and Technology.

Les 95 isolats bactériens ont été classés en 12 groupes selon leur profil RFLP généré après digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HaeIII*. Neuf groupes correspondaient à des genres bactériens référencés dans la base de données du laboratoire URF constituée d'espèces les plus fréquemment isolées à partir de laits ou des fromages. Neuf profils RFLP (G1, G2, G3, G6, G7, G8, G10, G11, et G12) correspondaient à des genres différents tandis que les profils de 3 groupes (G4, G5 et G9) ne présentaient aucune similarité avec ceux disponibles dans la base de données. Quarante six isolats appartenant aux groupes G1 à G5 correspondant à des bactéries lactiques ont été identifiés par amplification avec des amorces spécifiques et par séquençage de leur ADNr 16S. Ainsi, 14 isolats de G1 ont été affectés à *Lb. casei* ou *paracasei*, les deux autres isolats de ce groupe à *Lb. curvatus*, les 12 isolats de G2 à *Ln. mesenteroides* ou *pseudomesenteroides* et les 11 isolats de G3 à *E. faecalis*. Certains représentants des isolats des autres groupes ont été identifiés uniquement par séquençage de l'ADNr 16S. Leurs séquences d'ADNr 16S présentaient plus de 99% d'homologie avec celles des espèces suivantes: *Cb. mobile* (G4, 2 isolats), *Marini. psychrotolerans* (G5, 5 isolats), *A. nicotiana* ou *arilaitensis* (G6, 1 isolat), *A. ardleyensis* ou *bergerei* (G6, 6 isolats), *B. casei*, *B. antiquum* ou *casei* (G7, 3 isolats), *Brachybacterium sp.* (G8, 1 isolat), *S. pulvereri*, *S. xylosus* (G10, 4 isolats), *P. fluorescens* ou *syringae* (G11, 3 isolats), *Ser. proteomaculans* ou *liquefaciens* (G12, 2 isolats) et *Prot. vulgaris* (G9, 4 isolats).

Seize isolats de levures ont été identifiés comme *Candida sake* (11 isolats), *Yarrowia lipolytica* (2 isolats) et *Debaryomyces hansenii* (3 isolats) sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques et du séquençage de l'ADN 26S. Un isolat de *Geotrichum*, et 2 types de *Mucor* ont été également identifiés par observation microscopique uniquement.

	AI (5-1)	AI (8-5)	AI (11-8)	AI (14-11)	AI (18-14)	AI (21-18)	AI (25-21)	AI (28-25)	Σ AI
ABCDE	0,96	0,00	2,12	2,11	-1,32	-0,18	-0,05	-1,43	2,22
ABCD	0,00	0,00	-0,11	-0,73	-2,35	-0,55	-0,21	-1,98	-5,93
ABCE	0,96	0,00	2,12	3,07	0,91	0,84	1,67	0,20	9,76
ABDE	0,96	0,00	-0,04	-0,18	-0,88	-0,37	-0,10	-0,70	-1,31
ACDE	0,96	0,00	1,13	-0,18	-2,68	0,33	1,05	-1,02	-0,40
BCDE	0,00	-0,72	1,13	0,43	-2,51	-0,86	-0,46	-1,49	-4,48

Tableau 23 : Aires d'inhibition de *L. monocytogenes* à la surface des fromages inoculés avec les consortiums reconstitués (1^{ère} série de reconstitution)

AI = aires d'inhibition. $AI = (t_2 - t_1) / 2 * [(Ct_2 + Ct_1) - (Tt_2 + Tt_1)]$ avec C = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages contrôle et T = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages inoculés avec les différents consortiums, $(t_2 - t_1)$ = les temps d'affinage. Surfaces des fromages inoculés avec les différents consortiums ABCDE, ABCD, ABCE, ABDE, ACDE et BCDE avec A = 6 bactéries lactiques, B = 7 bactéries à Gram positif catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures, E = 2 moisissures + *Geotrichum sp.*

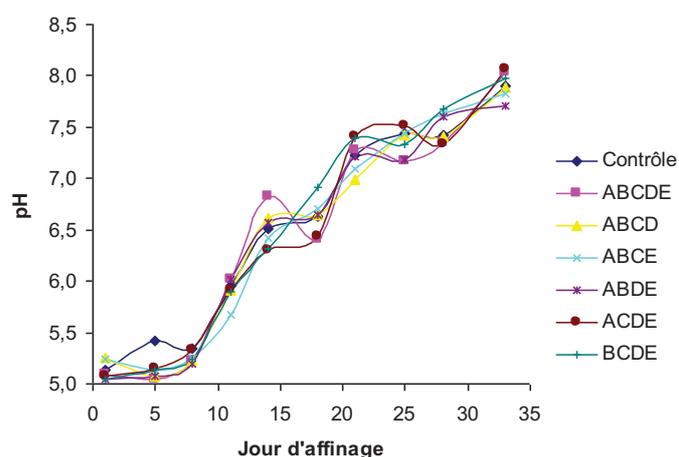


Figure 7 : Evolution du pH des croûtes des fromages inoculés avec les consortiums reconstitués (1^{ère} série de reconstitution)

Moyennes de 3 points de mesure de pH sur la croûte. Ecart types entre 0 et 0,04 jusqu'à 21 jours et 0,01 et 0,16 jusqu'à 28 jours. Surfaces des fromages inoculés avec les différents consortiums : Contrôle = ferment de surface commercial, ABCDE, ABCD, ABCE, ABDE, ACDE et BCDE avec A = 6 bactéries lactiques, B = 7 bactéries à Gram positif catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures, E = 2 moisissures + *Geotrichum sp.*

Dans un premier temps, les propriétés anti-listeria des souches de cette collection ont été évaluées selon une méthode de diffusion en gélose adaptée de celle de Tagg et Mc Given (1971). Dans un deuxième temps, la capacité inhibitrice vis-à-vis de *L. monocytogenes* de communautés plus ou moins complexes associant plusieurs souches de cette collection a été évaluée sur croûte de fromage type Saint Nectaire selon la même méthodologie que celle utilisée dans la partie criblage.

3.2. Propriétés anti-listeria in vitro des isolats bactériens et levures constituant le consortium complexe TR15

Par test de diffusion sur milieu gélosé selon la méthode Tagg et Mc Given, aucun des surnageants de culture des isolats de cette collection décrite n'est capable d'inhiber la croissance de *L. monocytogenes*. Les conditions du test, après filtration et neutralisation des surnageants permettent de détecter des substances inhibitrices de type bactériocine. Il semblerait donc qu'aucune souche n'en produise dans les conditions du test.

4. Propriétés anti-listeria des consortiums reconstitués sur la surface du fromage modèle

4.1. Première série de reconstitution

Le criblage des propriétés inhibitrices sur milieu gélosé (cf. 3.2) ne nous a pas permis de sélectionner des souches inhibitrices à inclure en priorité dans la définition des consortiums. Par conséquent, nous avons choisi de reconstituer une communauté microbienne complexe en faisant l'hypothèse que l'inhibition n'était pas souche dépendante mais serait plutôt associée aux grands groupes taxonomiques : bactéries lactiques (nommé A), bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive (nommé B), bactéries à Gram négatif (nommé C), levures (nommé D), *Geotrichum* + moisissures (nommé E). Une communauté complexe constituée de 22 espèces (1 souche par espèce) de bactéries, levures et moisissures (ABCDE) de la collection préalablement établie (cf. paragraphe 2.2.6 du Matériels et Méthodes et Tableau 13) a été constituée en choisissant les souches au hasard. Pour identifier le groupe microbien pouvant moduler positivement ou négativement la croissance de *L. monocytogenes*, des consortiums ont été constitués en omettant un de ces groupes A, B, C, D ou E.

Leurs propriétés anti-listeria, la dynamique des populations microbiennes et la production et/ou consommation des sucres et acides organiques à la surface des fromages ont été suivies.

	<i>Lactobacilli</i>		<i>Ln. mesenteroides</i>		<i>E. faecalis</i>		Total CRBM		Total RPF		Gram négatif		Total levures		<i>Penicillium commune</i>	
	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t	N j1	Nmax t
ABCDE	2,3	6,9	<2	25	2,0	5,1	4,1	8,3	2,2	5,6	2,5	9,2	<2	8,2	4,4	7,9
ABCD	2,0	6,4	<2	25	2,0	5,3	4,1	8,9	2,4	5,8	<2	8,8	<2	8,1	4,7	7,5
ABCE	<2	5,2	<2	28	<2	5,3	3,8	8,8	2,0	5,0	<2	9,2	<2	7,8	4,1	7,7
ABDE	2,0	5,3	2,0	28	2,0	5,7	2,0	9,0	2,7	5,2	<2	<3	2,7	7,8	3,9	7,5
ACDE	2,3	5,9	<2	21	<2	5,1	<2	<2	<2	<2	<2	9,2	<2	8,1	4	7,5
BCDE	<2	<2	<2	28	2,0	5,0	4,2	8,7	2,3	8,6	3,8	8,8	4,4	7,9	4,3	8,5

Tableau 24 : Niveaux des flores microbiennes sur les croûtes des fromages inoculés avec des consortiums reconstitués (1^{ère} série de reconstitution)

Résultats de dénombrements des flores sur les milieux de culture gélosés exprimés en log UFC/cm². Distinction des espèces en fonction du morphotype sur le milieu de dénombrement. Seuil de détection de 2 log UFC/cm². N j1 = dénombrement à 1 jour d'affinage (après inoculation) ; N max = niveau de flore maximum atteint durant l'affinage et t N max = temps pour atteindre le niveau de flore maximum.

Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums comme précisé dans la partie Matériels et Méthodes. Contrôle = ferment d'affinage, ABCDE, ABCD, ABCE, ABDE, ACDE et BCDE = consortiums reconstitués à partir des isolats identifiés dans le consortium complexe TR15 avec A = 6 bactéries lactiques, B = 7 bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures et E = 2 moisissures + *Geotrichum sp*

4.1.1. Inhibition de *L. monocytogenes* et pH

Six consortiums reconstitués (ABCDE, ABCD, ABCE, ABDE, ACDE et BCDE) dont la composition est précisée dans le tableau 23 ont été inoculés à la surface des fromages en présence de *L. monocytogenes*. Le consortium ABCDE le plus complexe n'est que faiblement inhibiteur (Σ AI = 2,22) et l'inhibition est nettement inférieure à celle notée pour le TR15 dans les expérimentations précédentes (Σ AI variant entre 10,24 et 37,39). De plus, compte tenu du seuil de significativité des AI établi à 2 unités (cf. paragraphe 4.2 de la partie Matériels et Méthodes), la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas inhibée de façon significative au cours de l'affinage. Le consortium ABCE est le plus inhibiteur jusqu'à 14 jours d'affinage (Tableau 23). Les autres consortiums et en particulier ABCD et BCDE semblent favoriser la croissance de *L. monocytogenes* (Σ AI entre -4,48 et -5,93).

Pour toutes les inoculations, le pH en surface des fromages augmente au cours du temps, d'une valeur moyenne de 5,13 à 1 jour, le pH atteint de valeurs variant entre 7,33 et 7,67 à 28 jours. Le pH des croûtes des fromages varie selon l'inoculation initiale entre 5,05 et 5,42 à 5 jours, 6,30 et 6,82 à 14 jours, 6,40 à 6,92 à 18 jours (Figure 7). Les croûtes des fromages inoculées avec le consortium ABCE présentent le pH le plus bas à 11 jours d'affinage (0,2 à 0,3 unités plus faible) ce qui pourrait expliquer sa capacité inhibitrice. Cependant, à un temps t donné le niveau de *L. monocytogenes* et le pH au même temps t ou au temps précédent ne sont pas corrélés ($r = 0,43$ à 11 jours, $r = 0,10$ à 18 jours, $r = -0,28$ à 28 jours).

4.1.2. Dénombrements des flores microbiennes au cours de l'affinage

Les dénombrements des flores microbiennes à 1 jour après inoculation, la valeur maximum de chaque type de flore et le temps pour les atteindre ont été répertoriés pour chaque consortium reconstitué (Tableau 24).

Les flores microbiennes des groupes A, B, C et D n'ont pas été détectées à la surface des fromages où elles n'ont pas été inoculées. Ainsi les *Lactobacillus* sont en dessous du seuil de détection sur la croûte des fromages BCDE et les levures en dessous du seuil de détection sur la croûte des fromages ABCE. Cependant sur le milieu SB a priori spécifique des Entérocoques, une flore est dénombrée sur les fromages BCDE non inoculés avec ce genre bactérien.

Sur ce milieu d'autres flores telles que *Aerococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* ont été détectées (Verdier-Metz, URF, communication personnelle).

Aucune flore *Leuconostoc* productrice de dextrane n'est détectée à 1 jour sur le milieu MSE sur aucune des croûtes de fromages inoculées avec des consortiums reconstitués contenant

cette espèce. Les niveaux à 1 jour et Nmax de *Lactobacillus* sur les croûtes des fromages inoculées avec les consortiums comprenant cette flore varient selon la composition en autres flores du consortium. Ainsi, les croûtes de fromages inoculées avec ABCE ont les niveaux les plus faibles en *Lactobacillus* ($<2 \log \text{ UFC/cm}^2$) à 1 jour comparées aux autres croûtesensemencées en bactéries lactiques (ABCDE, ABCD, ABDE, ACDE), celles inoculées avec le consortium ABCD ont un niveau maximum de *Lactobacillus* atteint à 25 jours parmi les plus élevés ($6,4 \log \text{ UFC/cm}^2$).

Les niveaux de *Staphylococcus* sur le milieu RPF sont les plus élevés sur les croûtes non inoculées en bactéries lactiques BCDE (N max = $8,6 \log \text{ UFC/cm}^2$) et les plus faibles sur celles inoculées avec ABCE (N max = $5 \log \text{ UFC/cm}^2$).

Les niveaux de bactéries à Gram négatif sont assez similaires sur toutes les croûtes de fromages où elles ont été inoculées (N max entre $8,8$ et $9,2 \log \text{ UFC/cm}^2$).

Les niveaux maximums des levures sont similaires sur toutes les croûtes mais leur croissance est plus importante dès 1 jour ($4,4 \log \text{ UFC/cm}^2$) sur la croûte de fromages non inoculées en bactéries lactiques (BCDE) et entre 1 et 11 jours ($8,1 \log \text{ UFC/cm}^2$) sur la croûte avec le consortium ABCD en l'absence de *Mucor*.

Le niveau de *Penicillium* est le plus élevé sur les croûtes BCDE non inoculées en bactéries lactiques (N max = $8,5 \log \text{ UFC/cm}^2$) alors que le niveau maximum est de $7,5 \log \text{ UFC/cm}^2$ sur toutes les autres croûtes. Les *Mucor* sont très vite envahissants sur le milieu OGA et il n'est donc pas possible d'obtenir un dénombrement fiable de cette espèce. Du fait du caractère envahissant de *Mucor* et de la prédominance de *Penicillium commune*, il est également difficile de différencier les espèces de levures implantées.

En conclusion, cette expérimentation ne nous permet pas de conclure clairement sur le rôle d'un des groupes A, B, C, D, E sur l'inhibition. Cependant, le consortium le plus inhibiteur ABCE se caractérise par des niveaux de levures $< 2 \log \text{ UFC/cm}^2$ et les plus faibles niveaux de *Lactobacillus* et *Staphylococcus* sur les croûtes en cours d'affinage. A l'opposé, les consortiums les moins inhibiteurs ABCD et BCDE ont en commun un fort développement des levures en début d'affinage. Par ailleurs, les croûtes des fromages avec le groupe E étaient envahies par des formes végétatives de *Mucor* difficiles à contrôler. Nous avons donc choisi d'éliminer ce groupe microbien E dans les futures expérimentations, même s'il pouvait présenter un intérêt.

4.2. Deuxième série de reconstitution

Afin de confirmer les résultats de la première reconstitution en l'absence des moisissures, 4 consortiums reconstitués ont été inoculés à la surface des fromages : ABCD, ABC, ABD et ACD. Le consortium complexe TR15 a également été inoculé pour servir de référence de l'inhibition. La composition des consortiums est détaillée dans le Tableau 13.

Les résultats de cette reconstitution sont intégrés dans la publication incluse page 167 intitulée *Is microbial diversity an asset for inhibiting Listeria monocytogenes in raw milk cheeses ?* dans Dairy Science and Technology. Ils sont résumés dans les paragraphes 4.2.1, 4.2.2 et 4.2.4.

4.2.1. Inhibition de *L. monocytogenes* et pH

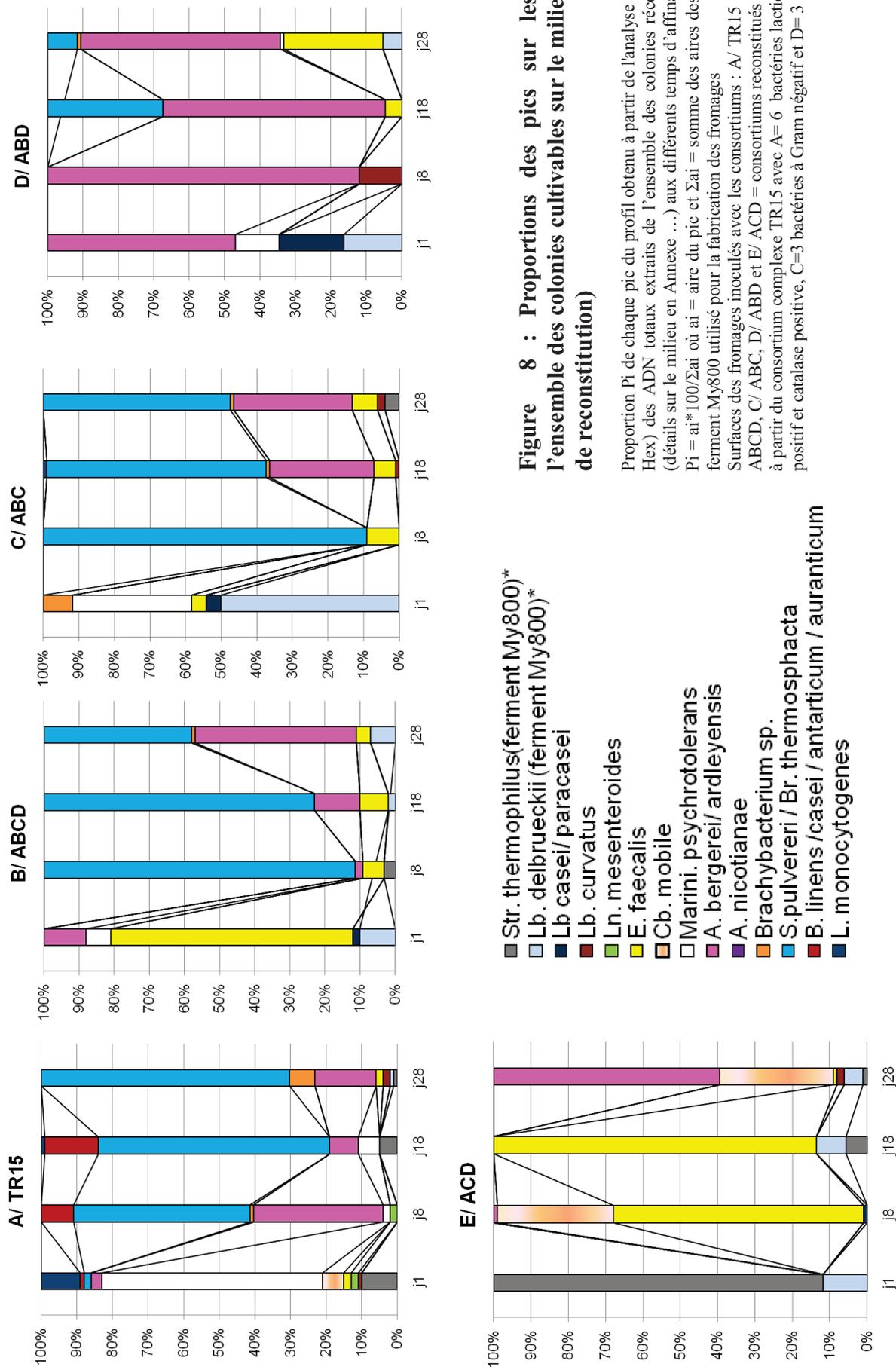
Les niveaux de *L. monocytogenes* étaient les plus élevés sur les fromages inoculés avec le ferment commercial et les plus faibles avec le consortium complexe TR15. L'inhibition exprimée en aire d'inhibition montre que les fromages inoculés avec le consortium complexe TR15 sont les plus inhibiteurs ($\Sigma AI = 30,19$) tandis que ceux inoculés avec les consortiums reconstitués ABCD ($\Sigma AI = 1,22$) et ABD ($\Sigma AI = 0,17$) sont les moins inhibiteurs. Entre 18 et 28 jours, *L. monocytogenes* est inhibée en présence du consortium reconstitué ACD ($AI (28-18) = 7,28$) et dans une moindre mesure avec le consortium ABC ($AI (28-18) = 5,65$) (cf. Table IV de l'article)

Comme précédemment précisé, il est difficile de corréler les valeurs de pH et les niveaux de *L. monocytogenes* aux différents temps d'affinage. Malgré des valeurs de pH à 1 jour variant de 5,52 à 6,17 en surface des fromages, les niveaux de *L. monocytogenes* restent en dessous du seuil de détection de 1 log UFC/cm². De plus, les valeurs de pH les plus faibles ne sont pas associées aux niveaux de *L. monocytogenes* les plus faibles au cours de l'affinage (cf. Table V de l'article).

4.2.2. Evolution des flores microbiennes au cours de l'affinage

L'évolution des flores microbiennes au cours de l'affinage a été suivie par méthodes culture dépendante (dénombrements) et indépendante (SSCP sur les croûtes) afin de vérifier si la perte d'inhibition dans les consortiums reconstitués était liée à une différence d'implantation et de dynamique des populations comparées au consortium complexe TR15 (cf. Table VI et VII de l'article).

Par méthode culture dépendante, les fromages inoculés avec le consortium complexe TR15 se distinguent des consortiums reconstitués par des niveaux plus élevés en lactobacilles et leuconostocs au début de l'affinage (au moins 1 log UFC/cm² plus élevé). En particulier, les



populations de leuconostocs producteurs de dextrane ne sont plus détectées sur le milieu MSE dès 8 jours d'affinage pour les fromages aux consortiums reconstitués. Parmi les bactéries à Gram positif et catalase positive dénombrables sur les différents milieux de culture, la population de *S. pulvereri* est la plus importante dans les consortiums reconstitués et augmente jusqu'à 18 jours. En revanche, pour le consortium complexe TR15, les populations d'*Arthrobacter sp.* dominant et sont en moyenne 1 à 1,5 log UFC/cm² plus élevées que la population de *S. pulvereri* au cours de l'affinage. Les populations de levures dominées par *Candida sake* et *Debaryomyces hansenii* augmentent principalement jusqu'à 8 jours puis se stabilisent.

L'analyse des profils bactériens SSCP des croûtes de fromages inoculées avec les différents consortiums révèle, à tous les temps d'affinage, la présence de pic correspondant au leuconostocs. Ce pic peut représenter jusqu'à 70% de la superficie des pics des profils des consortiums reconstitués à 18 ou 28 jours. Les profils SSCP des fromages inoculés avec le consortium complexe TR15 sont les plus divers avec 10 pics à 18 jours et 12 pics à 28 jours et sont caractérisés par la présence de *Cb. mobile*, *Marini. psychrotolerans*, *A. nicotiana* ou *arilaitensis*, *A. ardleyensis* ou *bergerei* et *Brachybacterium sp.* Par contre, à côté des leuconostocs, des pics correspondants à *S. pulvereri* et *A. bergerei* dominent les profils des croûtes de fromages aux consortiums reconstitués. Quels que soient les fromages, aucun pic correspondant aux populations de *B. linens* et *S. xylosus* n'est détecté.

4.2.3. Comparaison de la flore à Gram positif sur milieu CRBM

L'évaluation de la dynamique des populations cultivables sur le milieu CRBM (milieu pour le dénombrement des flores à Gram positif), par méthode SSCP n'ayant pas été insérée dans l'article publié, elle sera présentée ici. Les résultats pour le consortium complexe TR15 et les différents consortiums reconstitués sont présentés Figure 8. Ils confirment la plus grande diversité d'espèces de bactéries à Gram positif des croûtes de fromages inoculées avec le consortium complexe TR15 en particulier au début de l'affinage. L'indice de Shannon (H) du profil SSCP des colonies bactériennes récoltées sur CRBM est de 1,37 pour les croûtes des fromages à 1 jour du consortium TR15 alors qu'il est de 0,93 pour la combinaison ABCD et seulement de 0,72 pour ABC. Si à 18 jours les différences dans les indices de diversité subsistent, ils sont par contre similaires à 28 jours. L'indice de diversité des profils est très faible à 8 jours (Tableau 25). Les profils SSCP des espèces se développant sur le milieu CRBM des fromages inoculés avec TR15 et ceux avec les consortiums reconstitués se distinguent par des différences dans les populations dominantes à 1 jour.

	Milieu CRBM			
	j1	j8	j18	j28
TR15	1,37	1,14	1,13	1,04
ABCD	0,93	0,48	0,75	1,08
ABC	0,79	0,30	0,97	1,15
ABD	1,30	0,37	0,82	1,11
ACD	0,79	0,72	0,78	1,03

Tableau 25 : Indice de diversité sur le milieu de culture CRBM pour les différents consortiums inoculés à la surface des fromages (reconstitution 2)

Indice de diversité calculé selon la formule de Shannon $H = -\sum P_i * \ln(P_i)$ avec $P_i = a_i / \sum a_i$ où a_i est l'aire du pic du profil SSCP. Surfaces des fromages inoculés avec les consortiums : TR15 = consortium complexe ; ABCD, ABC, ABD et ACD = consortiums reconstitués à partir des isolats identifiés à partir du consortium complexe TR15 avec A= 6 bactéries lactiques, B= 7 bactéries à Gram positif et catalase positive, C=3 bactéries à Gram négatif et D= 3 levures

En effet si *Marini. psychrotolerans* (62% du profil) domine à 1 jour sur les milieux CRBM ensemencés avec les fromages TR15, *E. faecalis* domine dans ceux avec ABCD tandis que l'espèce *S. xylosus* est majoritaire dans les profils de ceux ensemencés avec ABC et ABD.

Ces espèces n'étaient pas détectées par SSCP directe à 1 jour en raison de la dominance d'un pic éluant avec *St. thermophilus*. Les fromages ACD sont dominés dans leur profil SSCP sur CRBM par les flores lactiques *E. faecalis* et *Cb. mobile* principalement. La présence de pics éluants avec les espèces *A. bergerei* et *S. xylosus* non inoculées, notamment pour les fromages à 28 jours, indique que les fromages ou le milieu de culture ont été contaminés. Dès 8 jours d'affinage, quelle que soit l'inoculation des milieux CRBM, les pics correspondant à *S. pulvereri* et ou *A. bergerei/ ardleyensis* deviennent dominants. L'analyse SSCP du milieu CRBM ensemencé avec TR15 révèle la présence de *S. xylosus* à 18 et jours et *B. linens /casei / antarcticum / auranticum* jusqu'à 18 jours, absents des profils SSCP des croûtes.

Cette analyse du milieu CRBM renseigne sur la sélectivité de ce milieu tel que préparé dans cette étude. Si ce milieu est sélectif des bactéries à Gram positif catalase positive, il permet aussi la croissance des bactéries lactiques et plus particulièrement des entérocoques. Cette analyse apporte une image complémentaire sur les équilibres entre les populations de bactéries à Gram positif. L'analyse confirme la présence d'espèces dans le consortium TR15 notamment au début de l'affinage telles que *Marini. psychrotolerans* ou *Brevibacterium* qui ne sont pas détectés dans les consortiums reconstitués.

4.2.4. Concentrations en acides organiques et en sucres à la surface des fromages

Les croûtes des fromages inoculées avec les différents consortiums sont caractérisées par une diminution rapide des concentrations en galactose de 2 à 28 jours d'affinage. De même, le lactate diminue rapidement entre 8 et 28 jours pour tous les fromages. Le formate n'a pas été détecté dans les croûtes des fromages inoculées avec le ferment commercial ou le consortium reconstitué ABC tandis que sa concentration augmente jusqu'à 18 jours pour les croûtes des fromages TR15, ABD et ACD. De même, une augmentation plus ou moins rapide des concentrations en acétate est observée pour TR15, ABCD, ABC, ABD et ACD entre 8 et 18 jours. Après 18 jours, la concentration en acétate continue d'augmenter pour les croûtes TR15 alors qu'elle a tendance à se stabiliser pour les consortiums reconstitués.

En conclusion, cette expérimentation confirme la difficulté de reconstituer des consortiums aussi inhibiteurs de *L. monocytogenes* que le consortium TR15, en sélectionnant uniquement une seule souche des différentes espèces. Elle renseigne sur la dynamique des flores lors de l'affinage et met en évidence que les espèces *S. pulvereri* et *Arthrobacter ardleyensis/ bergerei* sont les plus aptes à se développer sur les croûtes de fromages.

Au cours de l'affinage, l'implantation de ces espèces varie en fonction de la composition initiale des consortiums. A ce stade de l'étude plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la plus forte inhibition en présence du consortium complexe TR15 qu'avec les autres consortiums reconstitués. La première hypothèse attribuerait cette différence à une dominance des leuconostocs cultivables sur MSE, qui contribuerait à la production d'acétate qui pourrait être impliqué dans l'inhibition. En effet, aucun *Leuconostoc* producteur de dextrane (*Ln. mesenteroides*) n'était dénombré sur milieu MSE pour les croûtes de fromage ensemencées avec les consortiums reconstitués alors que cette population était importante sur celles avec le consortium TR15. Sa non détection sur milieu et sa présence sur les profils SSCP de croûtes aux consortiums reconstitués pourrait s'expliquer par la perte de cultivabilité sur MSE de la souche de leuconostoc inoculée (l'analyse SSCP détectant les bactéries mortes et vivantes), ou par une perte du caractère dextrane positif qui rend difficile sa quantification sur le milieu. La deuxième hypothèse expliquerait la plus forte inhibition après inoculation du TR15 par une diversité de population plus importante en début d'affinage et la présence de *Marini. psychrotolerans* et de *Cb. mobile*. Cette hypothèse est confortée par la plus forte proportion de ces espèces dans les consortiums inhibiteurs. De plus, la composition du consortium ABCD définie sur la base des espèces dominantes qui s'étaient implantées sur la croûte de fromages n'intègre pas la diversité des souches et ne reflète peut être pas la composition en espèces du consortium TR15. C'est pourquoi nous avons également choisi d'analyser plus finement la composition du consortium TR15 initial sans développement préalable sur croûte par une approche culture dépendante et indépendante.

Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses?

Émilie RETUREAU, Cécile CALLON, Robert DIDIENNE, Marie-Christine MONTEL*

INRA, UR545 Recherches Fromagères, 20 côte de Reyne, 15000 Aurillac, France

Received 4 June 2009 – Revised 4 December 2009 – Accepted 8 January 2010

Published online 30 March 2010

Abstract – This study aimed at determining if microbial diversity can be an asset to guarantee the microbial safety of raw milk cheeses. Our results show that microbial consortia from the surface of raw milk cheeses can self-protect against *Listeria monocytogenes*. Indeed, 10 complex microbial consortia among 34 tested from the surfaces of raw milk Saint-Nectaire cheeses were particularly effective for reducing the growth of *L. monocytogenes* on cheese surfaces in comparison of a commercial ripening culture, despite the high pH values on the surfaces. One of these consortia (TR15) was selected and propagated on cheese surfaces to create a collection of strains belonging to lactic acid bacteria, Gram-positive and catalase-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeasts. On the surfaces of uncooked cheeses, defined consortia consisting of combinations of several isolates from this collection displayed weaker antagonist activity against *L. monocytogenes* than the complex consortium TR15. The results from plate counting and analysis by single strand conformation polymorphism (SSCP) converged to show that microbial dynamics in cheeses TR15 differed from that of the defined consortia. TR15 cheeses had the highest levels of cultivable lactobacilli and leuconostocs. Their SSCP profiles were the richest in peaks and were characterised by the presence of *Marinilactibacillus psychrotolerans*, *Carnobacterium mobile*, *Arthrobacter nicotianae* or *A. arilaitensis*, *Arthrobacter ardleyensis* or *A. bergerei* and *Brachybacterium* sp. Further investigation will be necessary to gain a better understanding of the microbial interactions involved in inhibiting *L. monocytogenes*.

Listeria monocytogenes / microflora / inhibition / cheese / raw milk

摘要 – 微生物多样性是否可以抑制鲜乳干酪中的 *Listeria monocytogenes*。本研究旨在确定微生物多样性能否作为监测鲜乳干酪的微生物安全性的有效工具。结果表明来自鲜乳干酪表面的微生物菌群能够自我防护 *Listeria monocytogenes*。实际上，来自鲜奶干酪 St Nectaire 表面的 34 份供试微生物菌群中，比商业成熟发酵剂相比，有 10 个微生物菌群显著地降低了 *L. monocytogenes* 在干酪表面的生长，尽管在干酪表面具有高 pH 值。微生物菌群 TR15 被接种于干酪表面，分离得到了乳酸菌、革兰氏阳性和过氧化氢酶阳性细菌以及革兰氏阴性细菌和酵母。在未加工干酪的表面，由上述分离菌株组成的菌株明确的微生物菌群，比 TR15 相比，对 *L. monocytogenes* 的抗性较弱。培养基平板计数和单链构象多态性 SSCP 分析结果，结果表明 TR15 在干酪中的微生物动态不同于明确菌株的微生物菌群的动态。TR15 干酪在琼脂培养基上含有最高水平的乳杆菌和明串珠菌。SSCP 分析也表明乳杆菌和明串珠菌最为丰富，同时含有 *Marinilactibacillus psychrotolerans*, *Carnobacterium mobile*, *Arthrobacter nicotianae* (或者 *Arthrobacter arilaitensis*), *Arthrobacter ardleyensis* (或者

*Corresponding author (通讯作者): cmontel@clermont.inra.fr

Arthrobacter bergerei) et *Brachybacterium* sp. 菌株。需要进一步研究以更好地理解抑制 *L. monocytogenes* 过程中微生物交互作用。

***Listeria monocytogenes* / 多样性 / 抑制 / 干酪 / 原料奶**

Résumé – La diversité microbienne est-elle un atout pour inhiber *Listeria monocytogenes* dans les fromages au lait cru ? L'objectif de l'étude était de déterminer si la biodiversité microbienne est un atout pour garantir la sécurité sanitaire des fromages au lait cru. Nos résultats montrent que les consortia microbiens naturellement présents à la surface des fromages peuvent auto-protéger les fromages contre *Listeria monocytogenes*. En effet, dix consortia complexes issus de croûtes de fromages de St Nectaire parmi 34 testés réduisaient la croissance de *L. monocytogenes* à la surface des fromages malgré leur pH élevé, en comparaison avec un ferment commercial de surface. Le consortium le plus inhibiteur (TR15) a été sélectionné. Une collection de souches de bactéries lactiques, de bactérie à Gram positif et catalase positive, de bactéries à Gram négatif et de levures, issues de la culture du consortium TR15 sur des fromages, a été constituée. À la surface d'un fromage à pâte pressée non cuite, le consortium complexe TR15 était plus inhibiteur que les communautés reconstituées en combinant les souches de la collection. Les résultats des dénombrements sur milieux gélosés et l'analyse par Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) convergiaient pour montrer que la dynamique microbienne sur les fromages obtenus avec le consortium TR15 se distinguait de celle des fromages obtenus avec les consortia reconstitués. Les fromages obtenus avec le consortium TR15 avaient les niveaux de lactobacilles et de leuconostocs cultivables les plus élevés. Leurs profils SSCP à la surface des fromages étaient les plus riches en pics et étaient caractérisés par la présence de *Carnobacterium mobile*, *Marinilactibacillus psychrotolerans*, *Arthrobacter nicotianae* ou *A. arilaitensis*, *Arthrobacter ardleyensis* ou *A. bergerei* et *Brachybacterium* sp. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les interactions microbiennes impliquées dans l'inhibition.

***Listeria monocytogenes* / microflore / inhibition / fromage / lait cru**

1. INTRODUCTION

Cheese production is an efficient branch of the food industry in France; in 2008, 1.85 million tons of cheeses were produced for a turnover of more than 7 billion euros. The economic importance of raw milk cheeses, which accounted for 14% of French cheese production in 2008, is connected with their gastronomic reputation, their high added value and their role in rural development and land use.

One of the most important features of raw milks is the diversity of their microbial communities. More than 150 microbial species of lactic acid bacteria, non-lactic bacteria, Gram-negative bacteria, yeasts and fungi have been identified in raw milks, with the qualitative and quantitative balances in terms of species and strains varying

from one milk to another. The microbes can generate a variety of flavouring compounds, generating all the diversity and richness of sensorial properties of raw milk cheeses, quite different than those of cheeses made from pasteurised or microfiltered milk [2, 6]. It cannot be denied that some pathogenic bacteria can contaminate milk or cheese. Nevertheless, the health risk with raw milk production is low, as witnessed by the low number of toxicoinfections associated with the consumption of raw milk cheeses [9, 10]. The microbial safety of these cheeses depends on hygiene measures, rigorous control and application of procedures adapted from Hazard Analysis and Critical Control Point.

Microbial diversity may help to improve the safety of raw milk cheeses. In fact microbial life, through a large number of

interactions between populations, is at the heart of “hurdle technology”. This technology involves microbes creating a succession of barriers such as low pH, inhibitory metabolites (organic acids, ethanol, etc.), peptides (bacteriocins) and nutritional competition. Hurdle technology is particularly effective for controlling pathogenic bacteria when combined with environmental barriers (temperature, water content of the cheese, etc.). *Listeria monocytogenes*, for example, may be inhibited on the surface of washed rind cheeses [13, 25]. Some microbial populations from raw milk cheeses (Saint-Nectaire [25] or Camembert [15]) have been shown to inhibit *L. monocytogenes*. The growth of *L. monocytogenes* has been shown to be highly dependent on the raw milk flora in soft cheeses and was also lower in a raw milk than in a sterilised one [5]. Lactic acid bacteria [29], Corynebacteria such as *Brevibacterium linens*, yeasts and fungi can inhibit *L. monocytogenes* [8, 16, 19, 30], mainly by secreting bactericidal and bacteriostatic substances. However, none of these studies clearly demonstrated how microbial populations interact in the inhibition. The aims of the present study were (i) to evaluate the antilisterial activities of complex microbial consortia from the surface of PDO Saint-Nectaire raw milk cheeses and (ii) to try to constitute microbial consortia with similar antilisterial activities to the complex one selected in a first step.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of undefined complex consortia from cheese surfaces

Thirty-four Saint-Nectaire raw milk cheeses named TR1–TR20 and TR22–TR35, prepared in different farms and ripened in different cellars for at least 18 days,

were obtained from ripeners in the Saint-Nectaire area. A quarter of each cheese's rind (cheese surface to a thickness of 3 mm) was sampled then blended in phosphate buffer (20 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.01 mol·L⁻¹ K₂HPO₄, Gomri, 1946) pH 7.5 (diluted 1 volume of sample to 10 volumes of buffer), two times for 2 min, using a stomacher blender (Inter-science, Saint-Nom-la-Bretèche, France). This homogenised rind suspension, referred to below as a “complex consortium”, was aliquoted and frozen at -20 °C.

2.2. Bacterial strains and microbial community isolates

2.2.1. *Listeria monocytogenes*

The purity of *L. monocytogenes* strain S1 [25] was checked on ALOA agar plate medium then precultured in TS-YE broth medium. After 18 h of incubation at 37 °C, the culture was centrifuged for 15 min at 5000 rpm and 4 °C and the supernatant discarded. The pellet was homogenised in sterile reconstituted skim milk supplemented with 15% glycerol and stored at -20 °C until its inoculation onto the cheese surfaces.

2.2.2. Characterisation of microbial isolates from complex cheese surface consortium TR15 cultivated on cheese

2.2.2.1. Collection of bacterial and yeast isolates from TR15 cultivated on cheese

In order to constitute simplified defined consortia that are able to inhibit *L. monocytogenes*, a collection of bacterial and yeast isolates was created from the complex consortium TR15, cultivated on cheese. TR15 was inoculated onto the surfaces of cheeses that were made from pasteurised milk.

Table 1. Phylogenetic affiliation of 95 bacterial isolates and 16 yeast isolates from complex consortium TR15 cultivated on cheeses.

Agar plate medium origin	RFLP clusters ¹	Number of isolates	Species-specific PCR amplifications ²							Number of sequenced isolates	Closest 16S and 26S rDNA sequences > 99% homology
			paracasei	Lpl	Lc	Lnn1	Lncit1	ddlE1	ddlF1		
<i>(a) Bacteria</i>											
FH and CRBM	G1	16	+	-	-	-	-	-	-	2	Gram+ Catalase- 2 <i>Lactobacillus casei</i>
MSE, FH and CRBM (days 11, 18, 21 and 28)	G2	12	-	-	+	-	-	-	-	2	2 <i>Lactobacillus curvatus</i>
SB and CRBM (days 21 and 28)	G3	11	-	-	-	-	-	+	-	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
CRBM (days 21 and 28)	G4	2	-	-	-	-	-	-	-	1	<i>Enterococcus faecalis</i>
CRBM (days 21 and 28)	G5	5	-	-	-	-	-	-	-	2	<i>Carnobacterium mobile</i>
CRBM (days 21 and 28)	G6	13	-	-	-	-	-	-	-	5	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>
CRBM (days 21 and 28)	G7	4	-	-	-	-	-	-	-	7	Gram+ Catalase+ 1 <i>Arthrobacter nicotianae</i> – <i>arilaitensis</i>
CRBM (days 21 and 28)	G8	1	-	-	-	-	-	-	-	3	6 <i>Arthrobacter ardeyensis</i> – <i>bergerei</i> 2 <i>Brevibacterium linens</i> – <i>casei</i>
CRBM (days 21 and 28)	G8	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1 <i>Brevibacterium casei</i> – <i>antiquum</i> (97% homology) <i>Brachybacterium</i> sp.

continued on next page

Table I. Continued.

Agar plate medium origin	RFLP clusters ¹	Number of isolates	Species-specific PCR amplifications ²	Number of sequenced isolates	Closest 16S and 26S rDNA sequences > 99% homology
CREM and RPF (days 18, 21 and 28)	G10	4		4	3 <i>Staphylococcus puberteri</i>
PCA + M + CV, CFC and RPF (days 18, 21 and 28)	G11	17		3	1 <i>Staphylococcus xylosum</i> Gram- <i>Pseudomonas fluorescens - syringae</i>
PCA + M + CV (day 18)	G12	2		2	<i>Serratia proteomaculans - liquefaciens</i>
RPF (days 18 and 21)	G9	8		4	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>(b) Yeasts</i>					
			Physiological identification³		
OGA (day 18)		11	<i>Candida sake/tropicalis</i>	2	<i>Candida sake</i>
OGA (day 18)		2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2	<i>Yarrowia lipolytica</i>
OGA (day 18)		3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	3	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Total number of isolates		111		46	

(a) Bacteria: 16S rRNA gene analysis by the RFLP method followed by 16S rRNA gene sequencing, (b) Yeasts: phenotypic identification and 26S rRNA gene sequencing. In brackets () are indicated the time of ripening where the isolate was found. Media details in Section 2.4.

¹ RFLP patterns were analysed with BioNumerics software using UPGMA analysis. Isolates with the same pattern were grouped together and one or several isolates from each group were analysed by 16S rDNA sequencing.

² The description of primers is given in Table II.

³ Phenotypic identification using the morphological, biochemical and physiological characteristics and assignment to species as described by Callon et al. [7].

Table II. PCR primers used for identification of isolates and SSCP analysis.

Primers ¹	Species target	Sequences	PCR conditions	Target
W02 W18	Bacterial 16S rDNA	GNTACCTTGTTACGACTT GAGTTTGATCMTGGCTCAG	25 cycles of: 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, 90 s at 72 °C	SSU 16S rDNA
W34 W49	Partial bacterial 16S rDNA	TTACCGGGGCTGTGGCAC ACGGTCCAGACTCCTACGGG	30 cycles of: 30 s at 96 °C, 30 s at 61 °C, 30 s at 72 °C	SSU 16S rDNA
Gram1F Gram2R	Partial bacterial 16S rDNA	CCTAATACATGCAAAGTCG CTCAGTCCCAATGTGGCC	30 cycles of: 30 s at 96 °C, 30 s at 52 °C, 45 s at 72 °C	SSU 16S rDNA
nl1 nl4	Yeast 26S rDNA	GCAATATCAATAAGCGGAGGAAAAG GGTCCGTGTTCAAGACGG	30 cycles of: 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C, 30 s at 72 °C	26S rDNA
<i>Paracasei</i> 16S 16rev	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	CACCGAGATTCAACATGG GAAAGGAGGTGATCCAGC	30 cycles of: 60 s at 94 °C, 00 s at 53 °C, 60 s at 72 °C	16S rDNA
16 forward Lpl	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GCTGGATCACCTCCTTTC ATGAGGTATCAACTTATT	30 cycles of: 60 s at 94 °C, 00 s at 53 °C, 60 s at 72 °C	16S/23S spacer region
16 forward Lc	<i>Lactobacillus curvatus</i>	GCTGGATCACCTCCTTTC TTGGTACTATTAATCTTAG	30 cycles of: 60 s at 94 °C, 00 s at 53 °C, 60 s at 72 °C	16S rRNA gene

continued on next page

Table II. Continued.

Primers ¹	Species target	Sequences	PCR conditions	Target
Lmm1	<i>Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides</i>	TGTCGCATGACACAAAAAGTTA	25 cycles of: 30 s at 94 °C, 30 s at 62 °C, 90 s at 72 °C	16S rDNA position 185 forward
Lmm2		ATCATTTCCTAITTCTAGCTG		
Lncit1	<i>Leuconostoc citreum</i>	ACTTAGTATCGCATGATATC	30 cycles of: 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C, 90 s at 72 °C	16S rDNA position 183 forward
Lncit2		AGTCGAGTTGCAGACTGCAG		
ddlE1	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT	30 cycles of: 60 s at 94 °C, 60 s at 54 °C, 60 s at 72 °C	glycopeptide resistance gene
ddlE2		ACGATTCAAAGCTAACTG		
ddlF1	<i>Enterococcus faecium</i>	TAGAGACATTGAATATGCC	30 cycles of: 60 s at 94 °C, 60 s at 54 °C, 60 s at 72 °C	
ddlF2		TCGAAATGTGCTACAATC		

¹ References [7, 11, 28].

The inoculated cheeses were ripened for 28 days at 9 °C and 95% relative humidity (RH) in the ripening room at INRA. The microorganisms able to establish themselves on the cheese surface were enumerated on various agar media at seven different ripening times (1, 8, 11, 18, 21, 25 and 28 days). The agar media presenting the highest number of colonies with different morphotypes were observed for samples taken at 11, 18, 21 and 28 days of ripening. The media presenting the highest diversity in terms of morphotypes were selected from these ripening times. From these agar media, 111 colonies, representative of each of the morphotypes observed, were isolated and purified before identification at species level (Tab. I).

2.2.2.2. Total DNA extraction

Total DNA from each isolate cultivated in an appropriate broth medium was extracted using Easy-DNA kit with phenol/chloroform (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions.

The ribosomal 16S rRNA genes (1450 bp) from all isolates were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the universal primers W02 and W18 (complete gene for bacterial strains – Tab. II) as described by Callon et al. [7].

2.2.2.3. Identification of bacterial isolates

The 16S rRNA genes of the isolates were screened by restriction fragment length polymorphism (RFLP) as described by Callon et al. [7]. The 16S rRNA RFLP profiles of the 111 isolates were compared using the BioNumerics software and the unweighted pair group method with arithmetic averages to obtain a dendrogram. Patterns showing > 90% similarity (calculated by Pearson's correlation) were grouped in the same cluster (G1–G12, see Tab. I). Each

cluster was assigned to a bacterial genus by comparing the profiles with those of a reference database. The reference database was composed of 109 different species from the laboratory collection, including Gram-positive lactic acid bacteria (27 strains), non-lactic Gram-positive bacteria (56 bacteria including 19 Staphylococci) and Gram-negative bacteria (26). The 16S rDNA of 1–7 isolates representing each restriction pattern (G1–G12) was sequenced or amplified with specific primers.

Specific sequences of 16S rRNA genes from isolates which were identified as lactic acid bacteria according to their RFLP profiles were amplified using specific PCR primers as described in Table II.

Twenty-five microlitres of bacterial 16S rRNA gene PCR amplification products were sequenced using W34 primer by GeneCust (Évry, France). The sequences were compared to the sequences available in the GenBank database using the Blast program. In this study, a 99% similarity was taken to assign an isolate to a species.

2.2.2.4. Identification of yeast isolates

Yeasts were identified by a combination of phenotypic tests and sequencing of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene as described by Callon et al. [7].

2.2.2.5. Antilisterial effect of microbial isolates

The antilisterial activity of each isolate in the collection was tested using the agar-well diffusion method as described by Saubusse et al. [28].

2.2.2.6. Creating defined microbial consortia

From the collection of strains from complex consortium TR15 that were able to grow on cheese surfaces, four different defined

consortia were made up. The most complex, called ABCD, was composed of 19 strains randomly selected for each microbial species identified (Tab. I): six species of Gram-positive lactic acid bacteria (Group A), seven species of Gram-positive and catalase-positive bacteria (Group B), three species of Gram-negative bacteria (Group C) and three species of yeasts (Group D). Each group was composed of one strain of each species as follows: Group A, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Marinilactibacillus psychrotolerans* and *Carnobacterium mobile*; Group B, *Arthrobacter ardleyensis* or *bergerei*, *Arthrobacter nicotianae* or *arilaitensis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus pulvereri*, *Brevibacterium antiquum* or *casei*, *Brevibacterium linens* or *casei* and *Brachybacterium* sp.; Group C, *Pseudomonas fluorescens* or *syringae*, *Serratia proteomaculans* or *liquefaciens* and *Proteus vulgaris*; Group D, *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica*. The strains could not be selected for their antilisterial properties as none of the isolates identified was able to inhibit *L. monocytogenes* by agar-well diffusion test in vitro. The three other defined consortia, ABC, ABD and ACD, were defined by omitting one group: either B, C or D.

Each isolate was purified on the appropriate agar plate medium and cultivated in 10 mL of the appropriate broth medium. The culture was centrifuged for 15 min at 8500 rpm and 4 °C. The pellet was homogenised in sterile reconstituted milk supplemented with 15% glycerol and with or without 5% ascorbate. Suspensions were transferred to 2 mL microtubes and stored at -20 °C until their inoculation onto the cheese surfaces. Before inoculation, suspensions were thawed in a water bath for 5 min at 25 °C, counted on agar media and diluted to inoculate the appropriate concentrations on the cheese surfaces.

2.3. Challenge test with *L. monocytogenes* on the surface of an uncooked pressed type cheese

2.3.1. Cheese manufacturing

Small cheeses (600 g) were made from pasteurised milk collected at a school farm (ENILV, Aurillac, France), using an uncooked pressed cheese method similar to that of Saint-Nectaire. Milk was pasteurised at 72 °C for 30 s, cooled to 33 °C then inoculated with 0.6% of a commercial starter culture (MY800, *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, Danisco, Sassenage, France) and with a commercial mould culture of *Penicillium nalgiovensis* (2.5 mL·200 L⁻¹, Laboratoire Interprofessionnel de Production – LIP, Aurillac, France). Forty-five minutes after adding 40 mL of calf rennet (Beaugel 520-Ets Coquard, Villefranche-sur-Saône, France), the curd was cut and gently stirred to eliminate whey. The curds were moulded and pressed for 24 h at 2.1 bar and 22 °C. After pressing, the cheeses (pH 5.14) were vacuum-packed and frozen at -20 °C until inoculation.

2.3.2. Inoculation of experimental cheese surfaces

The experimental cheeses made from pasteurised milk were thawed for 5 h at room temperature under a laminar hood and turned over each hour to remove excess water. In all trials, their surfaces were inoculated by depositing and brushing with a sterile toothbrush 1 mL of different microbial consortia containing strain 167 of *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* was inoculated at 2–5 colony-forming units (CFU)·cm⁻². The microbial consortia were inoculated in three sets of experiments.

In the first set of experiments, 34 different microbial consortia were inoculated;

corresponding to each of the complex cheese microbial consortia named TR1–TR20 and TR22–TR35, prepared as described in Section 2.1 and thawed in a 25 °C water bath before inoculation.

In the second set of experiments, consortium TR15, the most inhibitory of the 34, was inoculated after 3 and 24 months of storage at –20 °C in order to verify the stability of the antilisterial activity.

In the third set of experiments, five different microbial consortia were inoculated: one TR15 consortium (selected in the first set of experiments and stored at –20 °C) and four defined microbial consortia (ABCD, ABC, ACD and ABD). The inoculum level of each species was based on counting results obtained after growing TR15 on cheese. Each species of Groups A, B and D was inoculated at $2.7 \log \text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$. The Gram-negative bacteria (Group C) were inoculated at only $1 \log \text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Each set included a control, inoculated with 1 mL of a commercial ripening culture frequently used for manufacturing Saint-Nectaire cheese (*Penicillium nalgiovens* $3.10^4 \text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$, LIP, Aurillac, France).

The inoculated cheeses were ripened for 28 days in sterile stainless steel boxes in INRA's cellars at 8–9 °C, 98% RH (in the cellar). After 8 and 18 days of ripening, the cheeses were washed with sterile salt water (20% NaCl).

2.4. Microbial analysis

Rind samples 3 mm thick were taken from inoculated cheeses after 1, 8, 18 and 28 days of ripening, for microbial analysis.

L. monocytogenes was counted as prescribed in ISO 11 2090-2, by an accredited laboratory (LIAL, Aurillac, France).

The rind samples were blended in phosphate buffer ($20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.01 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$) pH 7.5 using a stomacher blender (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France). Each suspension

was diluted with Ringer's solution and appropriate dilutions were spread on agar plate media using a spiral system (DS+, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France).

As described by Millet et al. [25], the microbial populations were enumerated on the following agar plate media, according to morphotype: coagulase positive and negative Staphylococci on rabbit plasma fibrinogen agar (RPF); facultatively heterofermentative lactobacilli on facultatively heterofermentative agar (FH); dextran-producing leuconostocs on Mayeux Sandine and Elliker agar medium (MSE); enterococci on Slanetz and Bartley agar (SB); *Pseudomonas* on cephalosporin fucidin cetrinide (CFC) agar; Gram-positive and catalase-positive bacteria on cheese ripening bacteria medium (CRBM); Gram-negative bacteria on plate count agar (PCA) supplemented with milk and crystal violet (PCA + M + CV); yeasts and moulds on oxytetracycline glucose agar (OGA) medium. All media were purchased from Biokar.

On CRBM, white colonies corresponding to *S. pulvereri*, yellow or cream colonies corresponding to *A. ardleyensis* or *bergerei*, *A. nicotianae* or *arilaitensis* and *Brachybac* *terium* sp. and orange colonies corresponding to *S. xylosus* or *B. antiquum* or *casei* and *B. linens* or *casei* were counted specifically. On OGA medium, white colonies corresponding to *D. hansenii* or *C. sake* and cream colonies corresponding to *Y. lipolytica*.

Colony counts were expressed as $\log \text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$ of cheese rind. Counts $< 10 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ were shown as $< 1 \log \text{cm}^{-2}$.

2.4.1. Calculation of area of inhibition

In order to easily compare the *L. monocytogenes* populations of the different cheeses during ripening (second set of experiments), the area of inhibition (AI) between two ripening days (t_1 and t_2) was calculated using the following formula as

described by Saubusse et al. [28]

$$AI = (t_2 - t_1)/2 \times [(Ct_1 + Ct_2) - (Tt_1 + Tt_2)],$$

where *C* is the count of *L. monocytogenes* in control cheeses whose surfaces were inoculated with a commercial ripening culture and *T* is the count of *L. monocytogenes* in cheeses whose surfaces were inoculated with other microbial consortia.

2.5. Single strand conformation polymorphism analysis of the cheese rinds

Total genomic DNA was extracted from 1 g cheese rind sample at 1, 8, 18 and 28 days of ripening, using the phenol-chloroform method described by Delbès et al. [11]. Partial 16S rRNA gene sequences were amplified using Gram1F–Gram2R primers with Gram1F labelled with hexachloro derivative of fluorescein HEX and Gram2R labelled with fluorescein phosphoramidite NED [28]. The PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) products were analysed by SSCP capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 genetic analyser. The fluorescence signal was analysed using the Genescan analysis software. The SSCP peak patterns were aligned using internal standard genescan 400 Rox. The dominant peaks in the SSCP patterns obtained were assigned by comparing their migration with that of the 16 bacterial strains used to make up the microbial community. To analyse the different profiles, relative peak proportion P_i is determined as $P_i = a_i \times 100/\Sigma a_i$, where P_i is the proportion and Σa_i is the sum of the peak areas of the whole SSCP patterns.

2.6. Chemical analysis

2.6.1. pH measurements

The pH of cheese surface was measured at 1, 8, 18 and 28 days of ripening at three

locations on each cheese with a 926 VTV pH-meter with Ingold electrode 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France). The results are the means of the three measurements.

2.6.2. Analysis of sugar and organic acid contents of cheese surfaces by high pressure liquid chromatography

Suspensions of finely ground rind were prepared (10 g for organic acids and 10 g for sugar compounds) in 20 mL distilled water. After incubating for 1 h at 50 °C, the rind suspensions were homogenised using an Ultra-Turrax device at 9500 rpm for 2 min. Organic acids and sugar compounds were extracted as described by Leclercq-Perlat et al. [20]. Analysis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC system (Waters, Guyancourt, France) consisted of an automatic injector, two serial detectors (a UV detector 210 nm for organic acids and a differential refractometer for sugar compounds) and two integrators. The cation-exchange column (Aminex HPX-87H – Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was maintained at 35 °C. Sulphuric acid (0.1 mol·L⁻¹) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. Propionic acid (1%) was used as an internal standard.

The results were expressed in grams per kilogram of dry rind content.

3. RESULTS

3.1. Inhibition of *L. monocytogenes* on the surfaces of uncooked pressed type cheeses

The *L. monocytogenes* counts on the surfaces of cheeses inoculated with the 34 complex microbial consortia from Saint-Nectaire cheeses (TR1–TR20 and

TR22–TR34) and with a commercial ripening culture as a control, after different ripening times at 9 °C, are given in Table III. Results obtained for TR15 after several months of storage at –20 °C are also included.

The level of *L. monocytogenes* was below the detection threshold of 1 log CFU·cm⁻² after 1 and 8 days of ripening in most cheeses, whichever inoculation was used (TR1–TR20 and TR22–TR34). *L. monocytogenes* grew mainly between day 8 and day 18 and the *L. monocytogenes* count at days 8, 18 and 28 varied according to the consortium inoculated, allowing us to arbitrarily classify the cheeses in three groups. Group 1 (10 consortia) corresponded to cheeses with the lowest *L. monocytogenes* counts (below 5 log CFU·cm⁻²). Interestingly, one microbial consortium (TR15) from this group, tested several times, can be stored at –20 °C in phosphate buffer for at least 24 months without losing its capacity to inhibit *Listeria* compared to a control. In Group 2 (15 consortia), *L. monocytogenes* populations reached between 5.26 and 5.96 log CFU·cm⁻². Group 3 (9 consortia) had the highest *L. monocytogenes* counts – 6 log CFU·cm⁻² or more. The control cheeses inoculated with only the commercial ripening culture were in this group.

There was no correlation between the count of *L. monocytogenes* at a given ripening time and the pH values; $r = 0.10$ at day 18 (pH varying between 6.20 and 7.52, $n = 35$) and $r = -0.14$ at day 28 (pH varying between 5.80 and 8.40, $n = 35$). However, the increase in pH during ripening was associated with an increase in *L. monocytogenes*.

Due to its high antilisterial properties and stability in storage at –20 °C, microbial consortium TR15 was selected for the subsequent studies of antilisterial activity.

3.2. Identification of strains from culture of cheese complex consortium TR15

Ninety-five bacterial isolates were distinguished in 12 RFLP patterns (clusters G1–G12). First, by reference to a database of reference strains most commonly isolated from milks or cheeses, nine RFLP profiles (G1–G3, G6–G8 and G10–G12) were first assigned to different genera. Profiles of three clusters (G4, G5 and G9) presented no similarity with those present in the database. The 46 isolates belonging to clusters G1–G5 corresponding to lactic acid bacteria were identified according to their amplification with specific primers and the identifications were confirmed by the closest match of their 16S rRNA in the GenBank database (Tab. I). Thus, 14 isolates of G1 were assigned to *Lb. casei* or *paracasei*, the other two isolates in this group to *Lb. curvatus*, the 12 isolates of G2 to *Ln. mesenteroides* or *pseudomesenteroides* and the 11 isolates of G3 to *E. faecalis*. Some representative isolates of the other groups were identified only by 16S rDNA sequencing (Tab. I). Their 16S rDNA sequences presented more than 99% homology with those of the following species: *Cb. mobile* (G4, two isolates), *M. psychrotolerans* (G5, five isolates), *A. nicotianae* or *arilaitensis* (G6, one isolate), *A. ardleyensis* or *bergerei* (G6, six isolates), *B. linens* or *casei*, *B. antiquum* or *casei* (G7, three isolates), *Brachybacterium* sp. (G8, one isolate), *S. pulvereri*, *S. xylosus* (G10, four isolates), *P. fluorescens* or *syringae* (G11, three isolates), *Ser. proteomaculans* or *liquefaciens* (G12, two isolates) and *Prot. vulgaris* (G9, four isolates).

The 16 yeast isolates were identified as *C. sake* (11 isolates), *Y. lipolytica* (three isolates) and *D. hansenii* (three isolates) on the basis of their phenotypic characteristics and 26S DNA sequencing (Tab. I).

Table III. pH and *L. monocytogenes* growth during ripening on the surfaces of trial cheeses inoculated with 34 complex consortia collected from cheese surfaces in the Saint-Nectaire area.

Group	Trial cheese	<i>L. monocytogenes</i> log CFU·cm ⁻²				pH	
		Day 1 ¹	Day 8 ¹	Day 18	Day 28	Day 18	Day 28
G1	TR15.1	1.48	< 1	3.33	4.05	6.42	7.12
	TR15.2	< 1	1.48	3.34	4.11	7.17	7.83
	TR15.3	< 1	1.18	2.01	3.32	7.27	7.71
	TR11	< 1	< 1	3.18	4.00	7.15	8.04
	TR26	< 1	< 1	3.26	4.13	6.72	6.75
	TR19	< 1	< 1	4.21	4.84	7.11	7.21
	TR13	< 1	1.78	4.01	4.86	7.10	6.84
	TR9	< 1	1.48	3.48	4.91	6.41	6.20
	TR22	< 1	1.96	3.74	4.93	6.74	6.73
	TR30	1.78	1.78	3.82	4.97	6.60	7.15
	TR24	1.48	< 1	3.18	5.04	6.63	6.93
	TR25	< 1	1.48	4.23	5.05	7.41	8.47
	G2	TR23	< 1	1.96	4.33	5.26	7.10
TR12		< 1	1.48	4.36	5.27	7.47	8.00
TR29		< 1	1.48	3.52	5.27	6.35	7.00
TR6		< 1	< 1	4.38	5.34	7.17	8.18
TR8		< 1	< 1	4.17	5.39	7.14	8.06
TR34		< 1	1.48	4.03	5.44	6.98	6.70
TR20		1.48	1.96	4.47	5.45	6.92	6.10
TR28		1.96	< 1	4.24	5.52	7.34	8.26
TR16		< 1	2.44	3.94	5.63	7.05	8.21
TR32		1.48	2.08	4.66	5.66	6.28	6.85
TR2		< 1	< 1	4.48	5.69	7.34	7.85
TR17		1.48	1.78	3.76	5.74	6.48	6.87
TR1		1.78	< 1	4.09	5.93	6.21	7.03
TR31		2.52	2.88	4.52	5.96	7.05	7.96
TR35		< 1	< 1	4.27	5.96	6.97	7.06
G3	TR27	< 1	< 1	4.08	6.03	6.31	6.95
	TR3	1.48	< 1	4.29	6.08	7.14	6.82
	TR14	< 1	2.08	4.01	6.14	6.93	5.80
	Control 2	< 1	1.48	4.15	6.13	6.67	7.61
	Control 1	1.48	< 1	4.41	6.21	7.52	6.70
	TR33	< 1	< 1	4.23	6.23	7.14	5.96
	TR18	< 1	< 1	4.90	6.25	7.07	7.66
	TR10	1.96	2.33	5.45	6.34	6.42	6.97
	TR5	1.48	< 1	4.26	6.36	6.45	6.94
	TR4	< 1	< 1	4.71	6.40	6.67	5.91
	TR7	< 1	1.78	5.34	6.42	6.35	6.95
	Control 3	1.48	3.33	4.63	7.66	7.29	7.70

¹ At days 1 and 8, the level of *L. monocytogenes* was below the detection limit of 1 log CFU·cm⁻². Trial cheese, TRx = complex cheese surface consortium prepared as described in Section 2.1; Control = commercial ripening culture. Groups = Trial cheeses according to *L. monocytogenes* counts at 28 days of ripening: G1 = < 5 log CFU·cm⁻², G2 = < 6 log CFU·cm⁻² and G3 = > 6 log CFU·cm⁻². TR15.1 = 1st challenge test using complex cheese surface consortium TR15. Control 2 and Control 3 = commercial ripening culture from the 2nd and 3rd challenge tests, TR15.2 = 2nd challenge test using TR15 after 3 months of storage at -20 °C, TR15.3 = 3rd challenge test using TR15 after 24 months of storage at -20 °C.

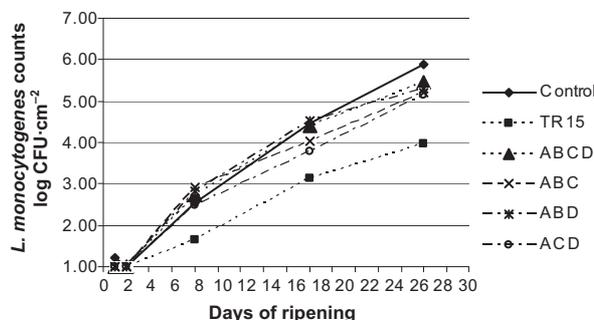


Figure 1. *L. monocytogenes* growth on the surfaces of cheeses inoculated with complex consortium TR15 and defined consortia. *L. monocytogenes* counts expressed in log CFU·cm⁻²; cheese surfaces inoculated with control = commercial ripening culture, TR15 = complex consortium (rind suspension), ABCD, ABC, ABD and ACD = defined consortia from identified isolates (A = six lactic acid bacteria, B = seven Gram-positive and catalase-positive bacteria, C = three Gram-negative bacteria and D = three yeasts).

Table IV. Areas of inhibition of *L. monocytogenes* growth on the surfaces of cheeses inoculated with complex consortium TR15 and defined microbial consortia.

	AI (8–2)	AI (18–8)	AI (28–18)
TR15	2.66	11.20	16.33
ABCD	-0.60	-0.66	2.48
ABC	-1.11	0.39	5.65
ABD	-0.84	-1.70	2.71
ACD	0.12	3.69	7.28

AI = area of inhibition calculated between 2 days of ripening (t_2-t_1) according to the formula, $AI = (t_2 - t_1)/2 \times [(Ct_2 + Ct_1) - (Tt_2 + Tt_1)]$, with $C = L. monocytogenes$ counts in the control cheese and $T = L. monocytogenes$ counts in cheeses inoculated with consortia. Cheese surfaces inoculated with control = commercial ripening culture; TR15 = complex consortium (rind suspension) and ABCD, ABC, ABD and ACD = defined consortia from identified isolates (A = six lactic acid bacteria, B = seven Gram-positive and catalase-positive bacteria, C = three Gram-negative and D = three yeasts). Numbers in bold fonts indicate the highest inhibition.

3.3. Antilisterial properties on cheese surfaces of complex consortium TR15 and defined consortia

L. monocytogenes developed differently during ripening depending on the microbial consortium inoculated – complex consortium TR15 and defined consortia as shown in Figure 1. The lowest count was observed on cheese surfaces inoculated with complex consortium TR15 and the highest on those with only the commercial ripening culture.

The inhibition of *L. monocytogenes* was then evaluated by calculating the AI as described in the Section 2. The AI data and pH values are shown in Table IV. The higher the AI values, the stronger the inhibition of *L. monocytogenes*. Throughout the ripening, AI values were highest in cheeses inoculated with complex consortium TR15 and lowest in those inoculated with ABCD and ABD. Between days 18 and 28, *L. monocytogenes* was also inhibited (positive values of AI) in the

Table V. pH of cheese rinds inoculated with complex consortium TR15 or defined consortia.

	Day 1	Day 2	Day 8	Day 18	Day 28
Control	5.88	5.62	5.76	7.50	7.04
TR15	5.95	6.07	5.72	7.54	7.04
ABCD	5.77	5.52	5.56	7.46	7.45
ABC	5.93	6.06	5.55	7.58	7.33
ABD	5.90	6.09	5.92	7.58	7.29
ACD	6.17	5.81	5.73	7.58	7.32

pH values are means of three measurements for each time of ripening; cheese surfaces inoculated with control = commercial ripening culture; TR15 = complex consortium (rind suspension) and ABCD, ABC, ABD and ACD = defined consortia from identified isolates (A = six lactic acid bacteria, B = seven Gram-positive and catalase-positive bacteria, C = three Gram-negative bacteria and D = three yeasts).

presence of ACD and to a lesser extent with ABC.

3.4. Evolution of pH

At days 1 and 2, pH values ranged from 5.52 to 6.17 (Tab. V), but nevertheless *L. monocytogenes* counts were below the detection limit on the surfaces of all cheeses. In all cheeses, pH dropped between days 1 and 8, ranging between 5.56 and 5.92 at day 8. The lowest pH, at day 8 in cheese ABCD (pH 5.56) was not associated with the lowest count of *L. monocytogenes*. Between days 8 and 18, the pH increased dramatically, reaching 7.04–7.58 at day 18 in all cheeses (Tab. V). This was matched by an increase of close to 2 log CFU·cm⁻² in *L. monocytogenes* counts. At day 28, the control cheese had the lowest pH value (7.04), but the highest count of *L. monocytogenes*.

3.5. Dynamics of microbial populations by culture-dependent methods

At all stage of ripening, it was difficult to control Gram-negative bacteria. They were present in abundance on the surfaces of all the cheeses (9.1 log CFU·cm⁻² in TR15 to 9.7 log CFU·cm⁻² in ABCD), even the ABD cheeses (8.9 log CFU·cm⁻² at

28 days) on which they had not been inoculated (Tab. VI).

At days 1 and 8, the highest lactobacilli count was on the surface of cheeses inoculated with consortium TR15, at least 1 log CFU·cm⁻² higher than in the other cheeses, except for the ACD cheeses where the counts at day 8 were similar to those for TR15 (5.6 log CFU·cm⁻²; Tab. VI).

At day 1, dextran-producing leuconostocs were detected in all cheeses inoculated with any of the five microbial consortia. As with the lactobacilli, leuconostoc counts were at least 1 log CFU·cm⁻² lower in the defined consortia than in complex consortium TR15. However, leuconostocs were counted at every ripening time on the surfaces of cheeses inoculated with TR15, where they reached 7.7 log CFU·cm⁻² at day 28. In cheeses prepared with defined consortia, they were not found on MSE medium up to day 8.

Until day 18, the trend in *E. faecalis* counts was similar in cheeses inoculated with complex consortium TR15 and defined consortia ABD and ACD. From day 18 to 28, they increased to 6.9 log CFU·cm⁻² in cheeses inoculated with ABD and ACD, but remained stable at 5.6 log CFU·cm⁻² in cheeses inoculated with complex consortium TR15. There was no growth of *E. faecalis* in cheeses inoculated with ABC (consortium without yeasts).

Table VI. Microbial population counts during ripening on the surfaces of cheeses inoculated with complex consortium TR15 and defined consortia.

	TR15	ABCD	ABC	ABD	ACD
<i>Lactobacillus</i> sp.					
Day 1	4.9	3.6	3.6	3.8	2.8
Day 8	5.4	4.5	4.7	3.5	5.6
Day 18	6.1	6.6	6.8	7.1	7.5
Day 28	6.2	6.6	6.4	7.8	7.4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>					
Day 1	5.1	3.5	3.6	4.0	4.4
Day 8	6.1	< 2	< 2	< 2	< 2
Day 18	7.7	< 3	< 3	< 3	< 3
Day 28	7.5	< 3	< 3	< 3	< 3
<i>Enterococcus faecalis</i>					
Day 1	4.0	3.2	2.8	3.8	3.8
Day 8	4.5	2.9	2.4	4.3	4.4
Day 18	5.6	4.2	4.0	5.7	5.5
Day 28	5.3	5.7	2.9	6.9	6.9
<i>Arthrobacter nicotianae</i> ; <i>Arthrobacter ardleyensis</i> or <i>bergerei</i> ; <i>Brachybacterium</i> sp.					
Day 1	3.5	3.9	3.6 ^a	4.2 ^a	< 2
Day 8	8.2 ^a	6.0	4.4	6.4	< 2
Day 18	8.5	8.4	8.1	7.8	< 3
Day 28	9.3 ^a	8.7	9.0	8.1	< 3
<i>Staphylococcus pulvereri</i>					
Day 1	< 3	3.2	3.6 ^a	4.2 ^a	< 2
Day 8	6.8	7.4	7.3	6.6	< 2
Day 18	7.1	8.4	8.5	7.9	< 3
Day 28	9.3 ^a	8.4	8.0	8.0	< 3
<i>Gram-negative bacteria</i>					
Day 1	4.9	4.5	3.3	4.5	6.3
Day 8	7.8	6.9	6.9	7.2	7.6
Day 18	8.7	7.8	8.9	7.8	8.8
Day 28	9.1	9.7	9.5	8.9	9.6
<i>Candida sake</i>					
Day 1	4.2 ^a	3.1 ^a	< 2	4.6 ^a	4.5 ^a
Day 8	7.0	6.9	< 2	7.7	7.4
Day 18	8.4	7.9	< 3	8.0 ^b	8.3 ^b
Day 28	8.0	7.5	< 3	8.1 ^a	8.2 ^a

continued on next page

Table VI. Continued.

	TR15	ABCD	ABC	ABD	ACD
<i>Debaryomyces hansenii</i>					
Day 1	4.2 ^a	3.1 ^a	< 2	4.6 ^a	4.5 ^a
Day 8	7.1	7.4	< 2	6.8	7.5
Day 18	7.3	7.2	< 3	8.0 ^b	8.3 ^b
Day 28	7.9	8.0	< 3	8.1 ^a	8.2 ^a
<i>Yarrowia lipolytica</i>					
Day 1	4.2 ^a	3.1 ^a	< 2	4.6 ^a	4.5 ^a
Day 8	6.1	6.4	< 2	7.1	6.9
Day 18	6.9	6.0	< 3	7.5	7.4
Day 28	7.3	6.9	< 3	8.1 ^a	8.2 ^a
Total yeasts					
Day 1	4.2	3.1	< 2	4.6	4.5
Day 8	7.3	7.5	< 2	7.8	7.8
Day 18	8.4	7.9	< 3	8.1	8.3
Day 28	8.3	8.1	< 3	8.1	8.2

Cheese surfaces inoculated with control = commercial ripening culture; TR15 = complex consortium (rind suspension) and ABCD, ABC, ABD and ACD = defined consortia from identified isolates (A = six lactic acid bacteria, B = seven Gram-positive and catalase-positive bacteria, C = three Gram-negative bacteria and D = three yeasts). Results expressed in log CFU·cm⁻².

^a Indicate the total count of species on media.

^b Counting value including *C. sake* and *D. hansenii*.

At day 8, *S. pulvereri* was the dominant population within the Gram-positive and catalase positive population in cheeses prepared with defined microbial consortia. Its level increased until day 18 and then stabilised around 8 log CFU·cm⁻². In these cheeses, the growth of *Arthrobacter* sp. was similar. In cheeses inoculated with complex consortium TR15 the increase in *Arthrobacter* sp. was > 1–1.5 log CFU·cm⁻² higher than for *S. pulvereri* throughout ripening. At day 28 it was difficult to count each species due to the great diversity of morphotypes on the plate (Tab. VI).

The yeast counts were similar in all cheeses and increased mainly before day 8, stabilising at 28 days at 8 log units (CFU·cm⁻²) with dominance of *C. sake* and *D. hansenii*. These two species were still the dominant populations at the end of ripening and their levels with the TR15 and ABCD consortia were similar. At 8

and 18 days counts of *Y. lipolytica* were higher in consortia ABD and ACD than in TR15 and ABCD.

3.6. Evaluation of bacterial balance on cheese rinds by a culture-independent method (direct SSCP) and by plate counting

Table VII shows the percentage of each bacterial population at 18 and 28 days of ripening, as assessed by the culture-independent method SSCP analysis targeting the V2 region of 16S rDNA and the culture-dependent plate counting method. Gram-negative bacteria have not been taken into account as they could not be detected by PCR-SSCP analysis of the V2 region of 16S rDNA. Moreover, data from days 1 and 8 of ripening are not considered because the SSCP V2 profiles were dominated by a single peak corresponding to

Table VII. Microbial populations' establishment at 18 and 28 days of ripening on the surfaces of cheeses inoculated with complex consortium TR15 and defined consortia, analysed by SSCP and counting on agar media.

	TR15						ABC						ABD						ACD					
	Day 18		Day 28		Day 18		Day 28		Day 18		Day 28		Day 18		Day 28		Day 18		Day 28					
	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate	SSCP	Plate				
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	-	0.4	2	0.1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	7.8	<i>d</i>	19.8	5	99	3	74.4				
<i>Lactobacillus curvatus</i>	-	-	5	-	-	1	-	-	5	-	-	-	-	-	<i>d</i>	-	1	-	<i>d</i>					
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (MY 800)*	3	4	4	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	22	15	3	1.6	7	17	71	30	50	3	73	78	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	1	10	11	11	1	6	4	10	2.6	<i>d</i>	1	-	-	-	-	-	25.2					
<i>Carnobacterium mobile</i>	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	5	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Arthrobacter nicoitanae</i> or <i>arilaitensis</i>	10	81	29	98.3	-	51.9	2	67.7	4	26.3	<i>d</i>	90.3	5	39.1	<i>d</i>	41.4	-	-	-					
<i>Arthrobacter ardeyensis</i> or <i>bergerei</i>	11	6	6	67	49	49	9	47	27	77	-	-	-	-	-	-	-	-	1					
<i>Brachybacterium</i> sp.	6	<i>d</i>	3	3	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Staphylococcus puberuli</i>	30	3.5	28	6	47.3	4	31.7	4	72.4	9.5	36.1	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-	1	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Brevibacterium linens</i> or <i>casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
<i>Brevibacterium anticum</i> or <i>casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

continued on next page

Table VII. Continued.

	TR15			ABCD			ABC			ABD			ACD		
	Day 18	Day 28													
	SSCP	Plate													
<i>Streptococcus thermophilus</i> (MY800)*	6	10	6	4	7	3	6	6	6	6	6	6	14	12	
<i>Listeria monocytogenes</i> Unknown 1	6	5	-	-	5	2	2	2	2	2	-	-	7	4	
	-	-	-	-	-	9	-	-	-	8	-	-	-	-	

Proportion of species on cheese rinds from TR15 = complex consortium (rind suspension) and ABCD, ABC, ABD and ACD = defined consortia from identified isolates (A = six lactic acid bacteria, B = seven Gram-positive and catalase-positive bacteria, C = three Gram-negative bacteria and D = three yeasts).

**L. delbrueckii* and *S. thermophilus* are strains from the commercial starter culture (My800) used for cheese manufacturing.

— straight line indicates that the proportion included the different species of the lines.

Plate = results expressed as a proportion of counted species on agar media. SSCP = results expressed as proportion of the peak (P_i) in the pattern with $P_i = a_i \times 100/\Sigma a_i$, where a_i = peak area and Σa_i = total peak area of the pattern. Species names on the same line indicate coelution in the same peak; n-dash

(-) indicates no detection and d' indicates detection of a peak < 1% of total pattern.

St. thermophilus. Both methods, PCR-SSCP and counting, led to the conclusion that *S. xylosum*, *B. linens* or *casei* and *B. antiquum* or *casei* were subdominant populations as they were not detected on the cheese surfaces by either of the two methods.

PCR-SSCP analysis of V2 region was more accurate than plate counting for detecting the diversity of the bacterial populations present on the cheese surfaces. Leuconostocs were detected in all SSCP cheese profiles from day 8 to 28, but were only quantified in TR15 cheeses by the culture-dependent method. This discrepancy may be due to the leuconostoc strain selected losing its ability to produce dextrans on MSE medium, whereas strains from the natural flora were still able to produce them. Then, the two methods gave quite different pictures of bacterial community. The leuconostoc peak can represent > 70% of the peaks on SSCP profiles for cheeses inoculated with defined consortia ABC at 18 days and ACD at 18 and 28 days. With plate counting the dominant populations in cheeses with defined consortium ACD were lactobacilli (99%) at 18 days and lactobacilli (74.4%) and *E. faecalis* (25.2%) at 28 days. The SSCP patterns of the cheese surfaces prepared with consortium TR15 were the most diverse, with 10 peaks in the profile at 18 days and 12 peaks in the profile at 28 days. They were characterised by the presence of *Cb. mobile*, *M. psychrotolerans*, *A. nicotianae* or *arilaitensis*, *A. ardleyensis* or *bergerei* and *Brachybacterium* sp. These species were not specifically quantifiable by plate counting. *S. pulvereri* represented 30% of the profiles of complex consortium TR15, whereas it was subdominant in cheeses with defined consortia (ABC and ABD). The plate counting method gave a quite different picture, as *S. pulvereri* was the dominant population in these cheeses. According to the PCR-SSCP analysis, *A. ardleyensis* or *bergerei* was dominant in cheeses with defined

consortia (ABCD, ABC and ABD) at day 28. Such discrepancies may either be due to *S. pulvereri* growing better than *A. ardleyensis* or *bergerei* on CRBM, or to better extraction and amplification of *A. ardleyensis* or *A. bergerei*-DNA for the SSCP analysis. Moreover, the SSCP method detects both dead and live cells.

3.7. Sugar and organic acid contents on cheese surfaces

The dynamics of lactate consumption was quite similar in all cheeses, with a decrease from day 8 to 28 (Fig. 2). In the same way, galactose content decreased rapidly from day 2 to 28 in all cheeses. A peak eluting with formate was not produced in the control and ABC cheeses. This molecule increased until day 18 in TR15, ABD and ACD cheeses and decreased after in cheeses TR15, ACD, whereas it remained stable in ABD cheeses. Maximum production was reached at 8 days for ABCD cheeses and was not detected at day 18. The acetate production curves also differed from one cheese to another. Acetate increased more or less rapidly between days 8 and 18 in all cheeses (Fig. 2). After days 18, acetate content decreased slightly in ABCD cheeses but tended to stabilise in ABC, ABD and ACD cheeses. In the control and TR15 cheeses, acetate content increased sharply between days 18 and 28.

4. DISCUSSION

Complex microbial consortia from the surface of raw milk Saint-Nectaire cheeses showed wide diversity in their ability to inhibit *L. monocytogenes*. The growth of *L. monocytogenes* was reduced for 10 out of the 34 cheeses inoculated with complex microbial consortia. This result shows that microbial consortia from raw milk cheeses can self-protect against some pathogens despite high pH values on their surfaces,

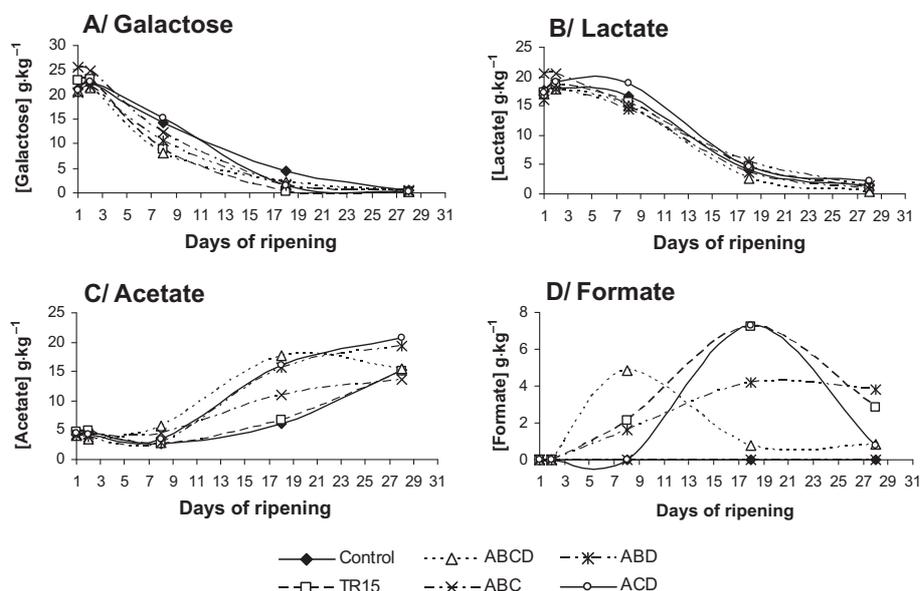


Figure 2. Galactose and organic acid contents on the surfaces of cheeses inoculated with complex consortium TR15 or defined consortia. All contents measured by HPLC at 1, 2, 18 and 28 days of ripening and expressed as $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of dry matter content of rind. Control = commercial ripening culture; TR15 = complex consortium (rind suspension); ABCD, ABC, ABD and ACD = defined consortia from identified isolates (A = six lactic acid bacteria, B = seven Gram-positive and catalase-positive bacteria, C = three Gram-negative bacteria and D = three yeasts).

which favours *L. monocytogenes* growth. This provides an argument for the safety of raw milk cheeses, in agreement with other published studies. For example, Eppert et al. [13] have described complex consortia from red smear cheeses that inhibited *L. monocytogenes*. Similarly, according to Guillier et al. [17], biofilm recovered from wooden shelves during ripening of soft and smear cheeses was able to inhibit *L. monocytogenes* growth.

Our study confirms the conclusions of studies [11, 14] showing that the picture of microbial community of cheeses varies according to the method used to assess them. The plate counting method and a culture-independent method (SSCP) provided complementary information about the dynamics of microbial populations on cheese surfaces inoculated with different microbial consortia.

By the plate counting method, the most inhibitory consortium, TR15, was distinguished from the others by its high level of lactic acid bacteria, including lactobacilli and leuconostocs, at the beginning of ripening, which may play a role in the inhibition. During ripening, on MSE medium a leuconostoc population was detected in complex consortium TR15 but not in the defined consortia, whereas PCR-SSCP analysis detected this population in all cheeses. This may mean that consortium TR15 had a different leuconostoc population to that in the defined consortia. The leuconostoc populations in the defined consortia may have lost their ability to produce dextran, and the SSCP analysis may have detected dead cells as well as live. The SSCP profiles of cheese surfaces with the complex cheese consortium TR15 were more diverse than the others. They were

characterised by the presence of *Cb. mobile*, *M. psychrotolerans*, *A. nicotianae* or *A. arilaitensis*, *A. ardleyensis* or *bergerei* and *Brachybacterium* sp., whereas the profiles of defined consortia were often dominated by only two or three species (*A. ardleyensis* or *bergerei*, *S. pulvereri* and *Ln. mesenteroides*). *M. psychrotolerans* and *Cb. mobile* are halophilic, alkalophilic lactic acid bacteria that have rarely been described in cheeses. They have been found in Saint-Nectaire cheeses [11], in red smear cheeses [14, 24] and Egyptian soft Domiati cheeses [12]. In smear cheeses, *Corynebacterium casei*, *A. nicotianae* and *B. linens* constituted more than 70% of the microbial population [3, 8, 24]. *S. pulvereri* has not often been described in cheeses other than Saint-Nectaire [11]. The population of Gram-negative bacteria present in our cheese was commonly described on the surfaces of cheeses [11, 14] not manufactured and ripened in sterile conditions. And in spite of the difficulty of controlling the proliferation of Gram-negative bacteria, differences in *L. monocytogenes* growth were still observed.

It can be hypothesised that these differences in the balance between groups of microorganisms may have a preponderant role in the inhibition, but it was not possible to identify one population as being responsible.

In the literature, inhibition in cheeses has been usually attributed to bacteriocin-producing strains even in the cases where the molecules have not been quantified. For example, Eppert et al. [13] reported that the inhibition of *L. monocytogenes* in red smear cheeses was due to a strain of *B. linens* producing linocin. Loessner et al. [22] showed that a pediocin produced by *Lactobacillus plantarum* could have an efficient antilisterial activity. In our study, none of the isolates used in the defined consortia were able to inhibit *L. monocytogenes* in the conditions of the agar-well diffusion method, suggesting

that bacteriocins were not involved in the inhibition.

A possible link between the inhibition of *L. monocytogenes* with galactose consumption and acid production has not yet been established. *L. monocytogenes* can be inhibited by formate and by acetate [26, 28]. A wide range of lactic acid bacteria including *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp. or *Ln. mesenteroides* [18] are able to produce acetate from lactose or galactose catabolism by the Leloir pathway or the T-tagatose pathway [1]. Moreover, some strains of lactic acid bacteria such as *E. faecalis* were shown to be able to co-metabolise lactate and citrate to produce acetate, formate and ethanol in a milk medium [27]. If most lactic acid bacteria may have the potentialities to catabolise lactate into acetate or formate [21], further investigations will be needed to characterise the capacity of production by the strains of our inhibitory complex consortium.

Lactate, an antilisterial substance, was consumed at the cheese surfaces. The catabolism of lactate is frequently attributed to yeast strains such as *D. hansenii* [4, 20] and *Y. lipolytica* [23]. In this study, the results did not enable us to link a specific microbial population and organic acid output to the inhibition of *L. monocytogenes*.

5. CONCLUSION

A natural cheese surface consortium having an antagonistic effect against *L. monocytogenes* was identified, but the strategy applied to reconstitute it failed to obtain a defined consortium with similar properties. New strategies need to be established to reconstitute this microbial consortium, taking better account of diversity at strain level, cell preparation and the physiological state of the cells. Further investigations will be needed to gain a better understanding of the microbial interactions involved in *L. monocytogenes* inhibition.

Some hypotheses made about the role of leuconostocs and lactobacilli should be checked.

Acknowledgements: This work is part of the TRUEFOOD project: TRUEFOOD – “Traditional United Europe Food” is an Integrated Project financed by the European Commission under the sixth Framework Programme for RTD – Contract no. FOOD-CT-2006-016264. The authors would like to thank René Lavigne for the cheese production and Béatrice Dessere for her helpful technical support. The authors are also grateful to Daniel Picque and especially Armelle Delile (INRA, UMR782 Génie et microbiologie des procédés alimentaires, Thiverval-Grignon, France) for HPLC analysis. English proofreading was done by Harriet Coleman.

REFERENCES

- [1] Bertelsen H., Andersen H., Tvede M., Fermentation of D-tagatose by human intestinal bacteria and dairy lactic acid bacteria, *Microb. Ecol. Health Dis.* 13 (2001) 87–95.
- [2] Beuvier E., Buchin S., Raw Milk Cheeses, in: Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General aspects, 3rd edn., Elsevier Ltd, London, UK, 2004, pp. 319–345.
- [3] Bonaiti C., Leclercq-Perlat M.-N., Latrille E., Corrieu G., Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: relative humidity and temperature influences, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 3976–3988.
- [4] Brennan N.M., Ward A.C., Beresford T.P., Fox P.F., Goodfellow M., Cogan T.M., Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 820–830.
- [5] Brouillaud-Delattre A., Maire M., Collette C., Mattei C., Lahellec C., Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 913–919.
- [6] Callon C., Berdagué J.L., Dufour E., Montel M.C., The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses, *J. Dairy Sci.* 88 (2005) 3840–3850.
- [7] Callon C., Duthoit F., Delbès C., Ferrand M., Le Frileux Y., De Crémoux R., Montel M.C., Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches, *Syst. Appl. Microbiol.* 30 (2007) 547–560.
- [8] Carnio M.C., Eppert I., Scherer S., Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their antilisterial potential, *Int. J. Food Microbiol.* 47 (1999) 89–97.
- [9] D’Amico D.J., Druart M.J., Donnelly C.W., Sixty-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant, *J. Food Prot.* 71 (2008) 1563–1571.
- [10] De Buyser M.L., Dufour B., Maire M., Lafarge V., Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries, *Int. J. Food Microbiol.* 67 (2001) 1–17.
- [11] Delbès C., Ali Mandjee L., Montel M.C., Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1882–1891.
- [12] El-Baradei G., Delacroix-Buchet A., Ogier J.-C., Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian domiati cheese, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1248–1255.
- [13] Eppert I., Valdes-Stauber N., Gotz H., Busse M., Scherer S., 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, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4812–4817.
- [14] Feurer C., Irlinger F., Spinnler H.E., Glaser P., Vallaeys T., Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods, *J. Appl. Microbiol.* 97 (2004) 546–556.
- [15] Gay M., Amgar A., Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and soft cheese made from raw milk, *Lait* 85 (2005) 153–170.
- [16] Goerges S., Aigner U., Silakowski B., Scherer S., Inhibition of *Listeria*

- monocytogenes* by food-borne yeasts, Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 313–318.
- [17] Guillier L., Stahl V., Hezard B., Notz E., Briandet R., Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves, Int. J. Food Microbiol. 128 (2008) 51–57.
- [18] Hemme D., Foucaud-Scheunemann C., Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods, Int. Dairy J. 14 (2004) 467–494.
- [19] Larsen A.G., Knochel S., Antimicrobial activity of food-related *Penicillium* sp. against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system, J. Appl. Microbiol. 83 (1997) 111–119.
- [20] Leclercq-Perlat M.N., Oumer A., Bergère J.L., Spinnler H.E., Corrieu G., Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese, J. Dairy Res. 66 (1999) 271–281.
- [21] Liu S.Q., Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations, Int. J. Food Microbiol. 83 (2003) 115–131.
- [22] Loessner M., Guenther S., Steffan S., Scherer S., A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 1854–1857.
- [23] Mansour S., Beckerich J.M., Bonnarme P., Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*, Appl. Environ. Microbiol. 74 (2008) 6505–6512.
- [24] Maoz A., Mayr R., Scherer S., Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 4012–4018.
- [25] Millet L., Saubusse M., Didienne R., Tessier L., Montel M.C., Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses, Int. J. Food Microbiol. 108 (2006) 105–114.
- [26] Ostling C.E., Lindgren S.E., Inhibition of enterobacteria and listeria growth by lactic, acetic and formic acids, J. Appl. Bacteriol. 75 (1993) 18–24.
- [27] Sarantinopoulos P., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229, Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 5482–5487.
- [28] Saubusse M., Millet L., Delbès C., Callon C., Montel M.C., Application of single strand conformation polymorphism – PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*, Int. J. Food Microbiol. 116 (2007) 126–135.
- [29] Teixeira de Carvalho A.A., Aparecida de Paula R., Mantovani H.C., Alencar de Moraes C., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami, Food Microbiol. 23 (2006) 213–219.
- [30] Valdes-Stauber N., Gotz H., Busse M., Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against listeria species, Int. J. Food Microbiol. 13 (1991) 119–130.

a) Aires d'inhibition

	AI (8-1)	AI (18-8)	AI (28-18)	Σ AI
TR15	-0,89	2,99	19,03	21,13
ABCD	1,69	-1,95	0,84	0,58
A(-)BCD	-6,01	-12,81	1,14	-17,68
Ln.	-0,51	-3,39	4,88	0,97

b) pH

	j1	j8	j18	j28
Contrôle	5,32	5,37	6,67	7,61
TR15	5,32	5,65	6,88	7,58
ABCD	5,57	5,80	7,15	7,51
A(-)BCD	5,44	6,77	6,94	7,71
Ln.	5,44	7,34	7,45	7,75

Tableau 26 : Aires d'inhibitions de *L. monocytogenes* et pH à la surface des fromages inoculés avec TR15 et les consortiums reconstitués (3^{ème} série de reconstitution)

a/ Aires d'inhibition : AI = aires d'inhibition. $AI = (t_2 - t_1) / 2 * [(C_{t_2} + C_{t_1}) - (T_{t_2} + T_{t_1})]$ avec C = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages contrôle et T = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages inoculés avec les différents consortiums, $(t_2 - t_1)$ = les temps d'affinage. b/ pH : Moyenne de 3 points de mesure sur la croûte des fromages à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage.

Moyennes de 3 points de mesures de pH sur la croûte à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage.

Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : Contrôle = ferment d'affinage, TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, ABCD, A(-)BCD = consortium reconstitué à partir des isolats identifiés dans le consortium complexe TR15 avec A = 6 bactéries lactiques, A (-) = 5 bactéries lactiques (*Ln. mesenteroides* n'est pas inoculé), B = 7 bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures, Ln. = *Ln. mesenteroides* seul.

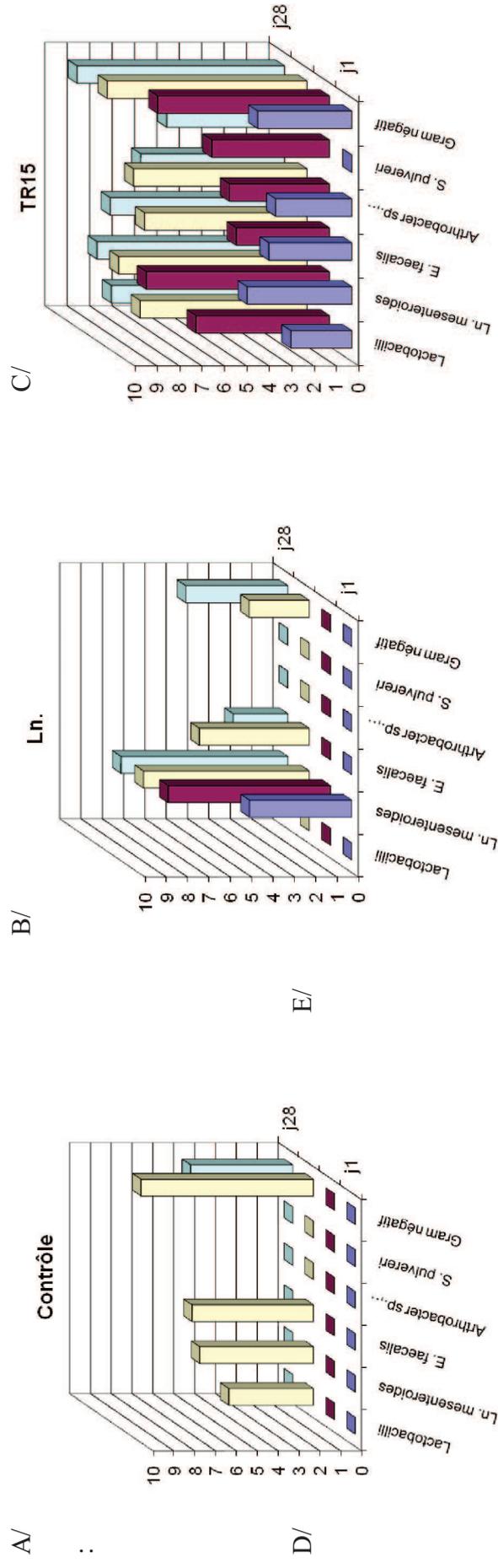
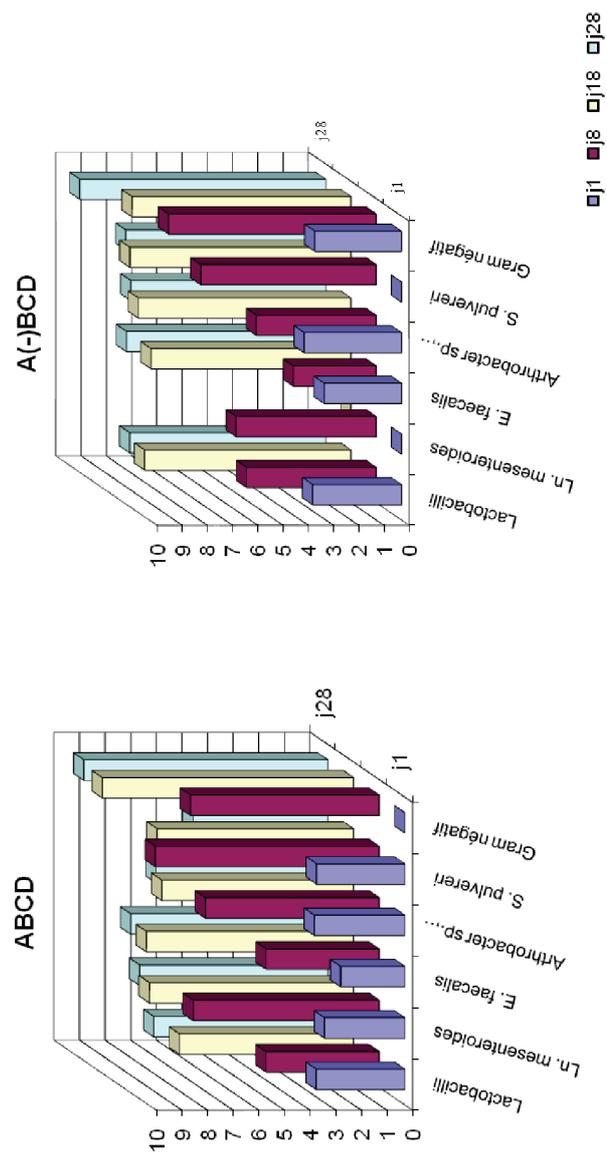


Figure 9 : Niveaux des flores microbiennes sur les croûtes des fromages inoculés avec TR15 et les consortiums reconstitués (3^{ème} série de reconstitution)

Niveaux des flores en log UFC/cm² à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage. Seules les groupes microbiens et espèces dominantes sont présentés. Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : A/ Contrôle = ferment d'affinage, B/ Ln. = *Ln. mesenteroides*, C/ TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, D / ABCD, E/ A(-)BCD = consortium reconstitué à partir des isolats identifiés dans le consortium complexe TR15 avec A = 6 bactéries lactiques, A (-) = 5 bactéries lactiques (*Ln. mesenteroides* n'est pas inoculé), B = 7 bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures.



4.3. Troisième série de reconstitution

Sur la base des hypothèses formulées après la deuxième série de reconstitution, cette troisième série de reconstitution avait pour objectif de déterminer si *Ln. mesenteroides* (producteurs de dextrans) pouvait intervenir dans l'inhibition de *L. monocytogenes*.

4.3.1. Pré culture de la souche de *Leuconostoc*

La mauvaise implantation de la souche de *Ln. mesenteroides* dans la 2^{ème} série de reconstitution, nous a conduit à modifier les conditions de pré-culture de cette souche. La souche a été pré-cultivée dans un bouillon MRS au lieu d'un bouillon BHI initialement utilisé comme précisé dans le paragraphe 2.2.5 de la partie Matériels et Méthodes. Son implantation à la surface des fromages a ensuite été vérifiée après son inoculation seule ou co-inoculée avec les autres espèces du consortium ABCD.

Après pré-culture sur bouillon MRS, à tous les temps d'affinage, les leuconostocs producteurs de dextrans dont *Ln. mesenteroides* fait partie sont détectés sur le milieu MSE que ce soit après ensemencement des croûtes des fromages inoculées avec la souche seule ou en présence des autres souches du consortium ABCD. A 5 jours d'affinage, le niveau de *Ln. mesenteroides* sur les croûtes des fromages où il est inoculé seul est de 4,33 log UFC/cm² alors qu'il n'est que de 3,13 log UFC/cm² pour les croûtes des fromages inoculés avec ABCD. Après 8 jours, la croissance de *Ln. mesenteroides* est plus importante sur les fromages avec ABCD et les niveaux atteints à 28 jours sont similaires (6,18 log UFC/cm² pour *Ln. mesenteroides* seul, 6,55 log UFC/cm² pour ABCD).

Ainsi, la souche de *Ln. mesenteroides*, pré-cultivée sur un bouillon MRS au lieu de BHI, s'implante et peut être mise en évidence sur le milieu MSE ce qui n'était pas le cas dans la 2^{ème} série de reconstitution. Il semblerait donc que la non détection sur le milieu MSE dans la 2^{ème} série de reconstitution soit attribuée aux conditions de pré-culture de celle-ci.

4.3.2. Inhibition de *L. monocytogenes* et pH

Ln. mesenteroides seul et deux consortiums reconstitués : ABCD contenant *Ln. mesenteroides* dans le groupe A et A(-)BCD sans cette souche ont été inoculés à la surface des fromages. Leur composition est détaillée dans le tableau 13 de la partie Matériels et Méthodes. Le consortium complexe TR15 a également été inoculé comme référence de l'inhibition.

Malgré des valeurs de pH à la surface des fromages similaires au contrôle, le consortium TR15 reste le plus inhibiteur tout au long de l'affinage et particulièrement entre 18 et 28 jours (AI (28-18) = 19,03 ; Σ AI = 21,13) (Tableau 26).

	j1	j8	j18	j28
Contrôle	<2	<2	<2	<2
TR15	3,4	8,1	7,6	8,0
ABCD	2,6	9,1	7,5	7,2
A(-)BCD	3,2	8,3	7,8	7,9
Ln.	<2	3,0	<2	<2

Tableau 27 : Niveaux de la flore totale des levures sur le milieu OGA (3^{ème} série de reconstitution)

Dénombrements en log UFC/cm² à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage. Seules les groupes microbiens et espèces dominantes sont présentés. Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : Contrôle = ferment d'affinage, Ln. = *Ln. mesenteroides*, TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, ABCD, A(-)BCD = consortium reconstitué à partir des isolats identifiés dans le consortium complexe TR15 avec A = 6 bactéries lactiques, A (-) = 5 bactéries lactiques (*Ln. mesenteroides* n'est pas inoculé), B = 7 bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures.

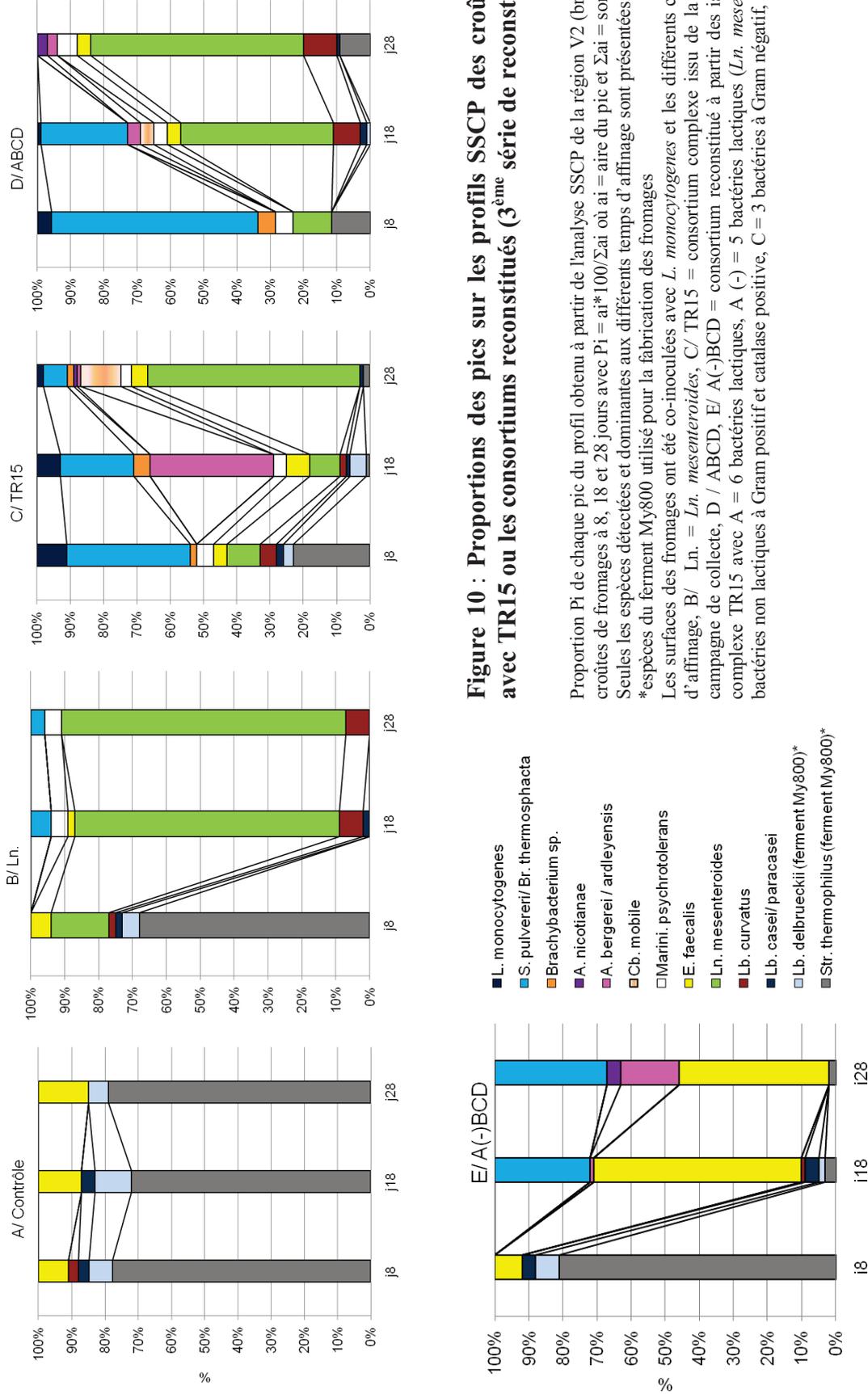
Jusqu'à 18 jours ni les consortiums reconstitués avec ou sans *Ln. mesenteroides* ER15.22, ni cette souche seule n'inhibe *L. monocytogenes*. La croissance serait même plus importante que sur les fromages contrôle (uniquement inoculés avec *Penicillium commune*), en particulier sur les croûtes avec le consortium A(-)BCD (AI (18-8) = -12,81) et dans une moindre mesure sur celles avec *Ln. mesenteroides* seul (AI (18-8) = -3,39) et ABCD (AI (18-8) = -1,95). Ceci pourrait s'expliquer par des valeurs de pH les plus faibles sur la croûte des fromages contrôle, qui sont de 1 à 1,5 unités inférieurs aux fromages avec A(-)BCD et *Ln. mesenteroides* ER15.22 (Tableau 18). Après 18 jours d'affinage, cette souche inoculée seule est plus inhibitrice (AI (28-18) = 4,88) qu'en présence des autres espèces bactériennes et levures des consortiums reconstitués (ABCD, A(-)BCD). A 18 jours, les croûtes des fromages inoculés avec *Ln. mesenteroides* seul ont cependant des valeurs de pH plus élevées (pH = 7,34) que celles avec ABCD (pH = 7,15) ou A(-)BCD (pH = 6,94). A 28 jours, *Ln. mesenteroides* seul (pH = 7,75) est cependant moins inhibiteur que le consortium complexe TR15 (pH 7,58).

4.3.3. Evolution des flores microbiennes au cours de l'affinage

Les caractéristiques microbiologiques des croûtes de fromage ont été évaluées par dénombrements sur différents milieux (figure 9), par analyse SSCP V2 directe des croûtes (figure 10), par analyse SSCP des bactéries se multipliant sur le milieu CRBM (figure 11).

Pour les croûtes des fromages contrôle et cellesensemencées uniquement avec *Ln. mesenteroides*, les résultats de dynamique des flores bactériennes par dénombrement et SSCP V2 directe sont concordants. Ils permettent de conclure que tout au long de l'affinage *Str. thermophilus* domine sur les croûtes des fromages contrôle. *Ln. mesenteroides* est la flore majoritaire des fromages inoculés uniquement avec cette espèce même si *Str. thermophilus* est dominant à 1 jour sur les profils SSCP et des contaminations ponctuelles par *E. faecalis* et des bactéries Gram négatif nettement sous dominants (figure 9 A et B, figure 10 A et B).

Pour les croûtesensemencées par les 3 autres consortiums TR15, ABCD, A(-)BCD, les dénombrements microbiens mettent en évidence le plus faible développement des *Lactobacillus* dans les fromages ABCD ; leurs niveaux de population à 18 jours d'affinage (6,8 log UFC/cm²) et 28 jours (6,8 log UFC/cm²) sont inférieurs d'un log à ceux des fromages TR15 (7,7 log UFC/cm² à 28 jours) et A(-)BCD (7,8 log UFC/cm² à 28 jours). Par contre, l'évolution des *Leuconostoc* producteurs de dextrans est similaire sur toutes les croûtes où *Ln. mesenteroides* a étéensemencé et leur niveau atteint 7 log UFC/cm² dès 8 jours (Figure 9 B, C, D). Sur les profils SSCP V2 des croûtes, cette espèce domine en fin d'affinage même si par dénombrement son niveau est équivalent à celui des lactobacilles. Les niveaux d'*E. faecalis* sont identiques sur les croûtes TR15, ABCD et A(-)BCD tout au long de l'affinage (Figure 10 C, D, E).



La dynamique des populations de bactéries à Gram positif et catalase positive est différente sur les croûtes TR15, ABCD et A(-)BCD. *Arthrobacter* et *Brachybacterium* ont le même aspect sur boîte, la non détection de *Brachybacterium* sur les profils SSCP des milieux CRBM pour ABCD laisse supposer que les colonies quantifiées sont des *Arthrobacter*. Sur les croûtes de fromage A(-)BCD, le niveau de *S. pulvereri* quantifié sur CRBM, en raison de son aspect caractéristique, augmente jusqu'à 18 jours pour atteindre 8,7 log UFC/cm² puis se stabilise alors qu'il diminue sur les croûtes ABCD dès 8 jours d'affinage (figure 9 D et E, figure 10). Cette espèce se développe faiblement sur les croûtes TR15 et son niveau à 8 jours n'est que de 5,2 log UFC/cm² (figure 10 C). Ce changement de proportion de *S. pulvereri* dans la population de bactéries à Gram positif est aussi visualisé sur les profils SSCP V2 des croûtes où sa proportion tend à diminuer dans ABCD et TR15 au profit de *Ln. mesenteroides* et se stabiliser dans A(-)BCD entre 18 et 28 jours (figure 10 C, D, E). Le niveau d'*A. bergerei* à 28 jours est plus élevé sur les croûtes A(-)BCD (7,73 log UFC/cm²) que sur les croûtes ABCD (6,71 log UFC/cm²) et TR15 (6,41 log UFC/cm²) (figure 9 C, D, E). Quoique présent sur les profils SSCP V2 des milieux CRBM, *Brevibacterium sp.* n'a pas pu être quantifié sur les boîtes car son aspect est similaire à celui de *S. xylosum*.

Les espèces *Cb. mobile*, *Marini. psychrotolerans* sont détectées sur les profils SSCP des croûtes de TR15 en particulier en fin d'affinage (figure 10 C). Elles sont cultivables sur milieu CRBM puisqu'elles sont présentes sur le profil SSCP des boîtes CRBMensemencées avec TR15 (figure 11). Sur le profil SSCP du milieu CRBMensemencée avec la croûte TR15 à 28 jours d'affinage, *Cb. mobile* représente 63% des pics du profil (figure 11). Son niveau pourrait donc être estimé à 5,4 log UFC/cm². Cependant, *Cb. mobile* ne peut pas être quantifié sur milieu CRBM par comptage de colonie car son aspect est similaire à celui d'*E. faecalis*.

Quelles que soient les croûtes (TR15, ABCD et A(-)BCD), les niveaux des 3 espèces de levures - *D. hansenii*, *C. sake*, *Y. lipolytica* – augmentent les 8 premiers jours d'affinage (tableau 27) mais la croissance de la flore totale des levures diffère d'une croûte à l'autre. En raison de la présence de *Penicillium commune* sur le milieu OGA, il est difficile de distinguer les 3 espèces. A 8 jours, le niveau des flores levures est le plus élevé pour les fromagesensemencés avec ABCD et serait dominé par les espèces *C. sake* et *D. hansenii*. Les niveaux des flores levures ont tendance à diminuer après 8 jours pour les croûtes des fromages ABCD et A(-)BCD. A 28 jours, les fromages TR15 et ABCD ont les mêmes niveaux en levures (8 log UFC/cm²) tandis que les fromages A(-)BCD ont les niveaux les plus faibles (7,2 log UFC/cm²).

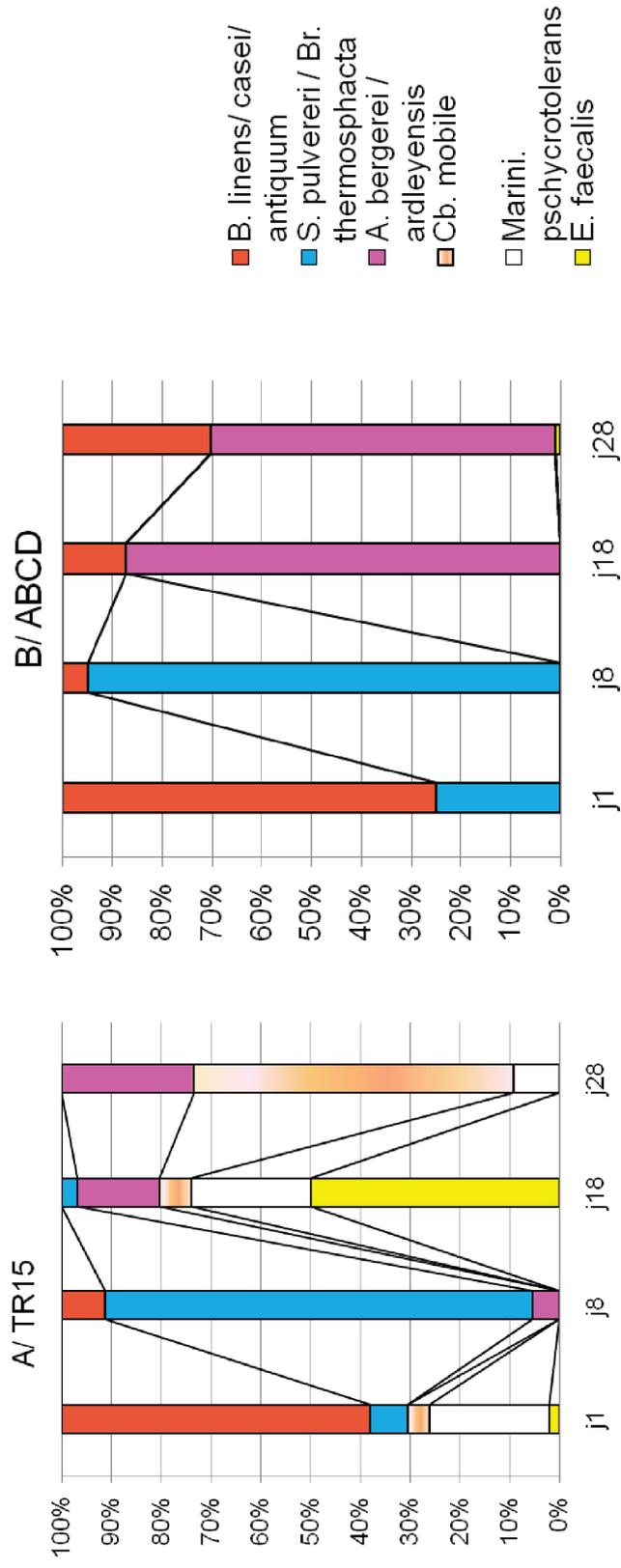


Figure 11 : Proportions des pics sur les profils SSCP de l'ensemble des colonies cultivables sur le milieu CRBM (3^{ème} série de reconstitution)

Proportion P_i de chaque pic du profil obtenu à partir de l'analyse SSCP de la région V2 (brin Hex) des ADN totaux des colonies récoltées sur le milieu CRBM à 1, 8, 18 et 28 jours avec $P_i = ai*100/\Sigma ai$ où $ai =$ aire du pic et $\Sigma ai =$ somme des aires des pics du profil. Seules les espèces détectées et dominantes aux différents temps d'affinage sont présentées. Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, ABCD = consortium reconstitué à partir des isolats identifiés dans le consortium complexe TR15 avec A = 6 bactéries lactiques, B = 7 bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures.

Les populations de bactéries à Gram négatif n'ont pas été analysées finement mais leurs niveaux globaux sur le milieu PCA+L+CV sont identiques sur toutes les croûtes et à des niveaux élevés entre 7 et 8 log UFC/cm² dès 8 jours (figure 9).

4.3.4. Concentrations en acides organiques et sucres à la surface des fromages

Les teneurs en sucres et acides organiques du consortium TR15 le plus inhibiteur et le consortium reconstitué ABCD le moins inhibiteur ont été comparées (Figure 12). Ainsi, la consommation du galactose est maximale entre 1 et 8 jours pour les deux inoculations des croûtes (Figure 12 A). Néanmoins, une consommation plus rapide est constatée pour les fromages TR15. Les concentrations en acide lactique augmentent jusqu'à 8 jours pour les fromages contrôle et ABCD puis diminuent rapidement jusqu'à 28 jours (2 à 3 mg/g). Par contre pour les fromages TR15, la concentration d'acide lactique est constante jusqu'à 8 jours (16,8 mg/g) puis diminue lentement jusqu'à 28 jours (9,3 mg/g) (Figure 12B). Les concentrations en acide acétique augmentent rapidement dès 8 jours d'affinage sur les croûtes avec le consortium TR15 et atteignent 3,5 mg/g à 28 jours alors qu'elles ne sont que de 2 mg/g ou inférieures sur celles avec le consortium ABCD et le contrôle (Figure 12C). L'acide formique est faiblement produit principalement après 8 jours sur les croûtes des fromages inoculés avec ABCD et TR15 (respectivement 0,35 mg/g et 0,10 mg/g) (Fig. 12D). La consommation moins rapide de l'acide lactique et la plus forte production d'acide acétique pour les fromages TR15 pourraient jouer un rôle dans l'inhibition.

Conclusions

Cette reconstitution montre que la mauvaise implantation des leuconostocs producteurs de dextrans dans la 2^{ème} série de reconstitution n'était pas à l'origine du moindre potentiel inhibiteur du consortium ABCD. En effet, malgré leur bonne implantation sur les croûtes ABCD de cette reconstitution, aucune inhibition équivalente à celle du consortium TR15 n'a été obtenue avec ce consortium. Cependant *Ln. mesenteroides* pourrait participer à l'inhibition de *L. monocytogenes* puisque le consortium A(-)BCD sans *Ln. mesenteroides* favorise la croissance de *L. monocytogenes* entre 8 et 18 jours d'affinage. De plus entre 18 et 28 jours, *Ln. mesenteroides* seul est plus inhibiteur que lorsqu'il est inoculé avec les autres flores lactiques, les bactéries à Gram positif et catalase positive, les bactéries à Gram négatif, ou les levures du consortium ABCD. Ceci suggère que les levures et les espèces bactériennes dominantes (*S. pulvereri*) pourraient contrecarrer l'effet inhibiteur de *Ln. mesenteroides*. L'absence de *Ln. mesenteroides* influence fortement la dynamique des populations de *Staphylococcus*.

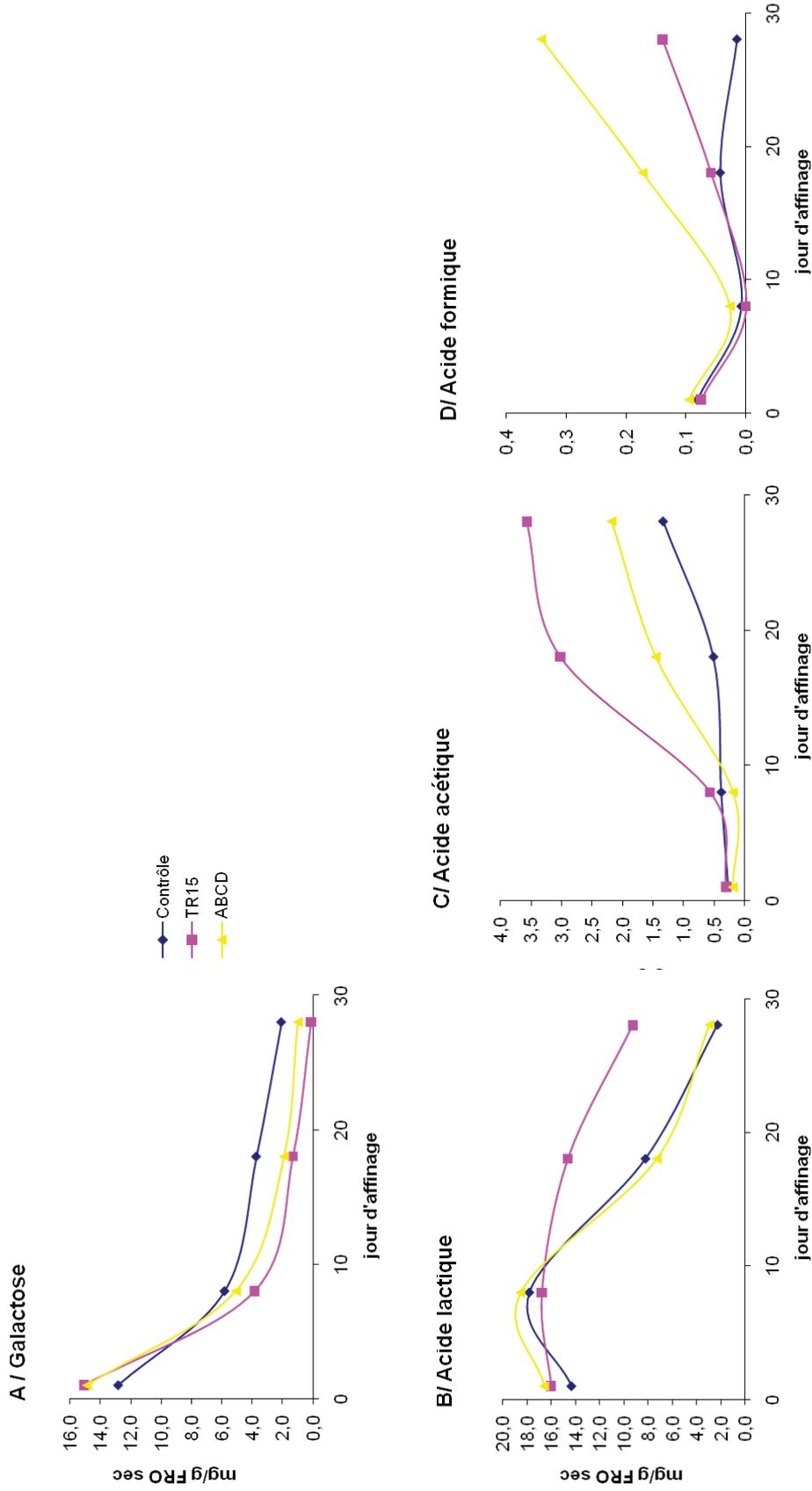


Figure 12 : Concentrations en galactose et acides organiques sur les croûtes des fromages inoculés avec les consortiums TR15 et ABCD (2^{ème} série de reconstitution)

Dosages réalisés par méthode HPLC pour le galactose et l'acide lactique, et par méthode enzymatique pour l'acide acétique et l'acide formique. Résultats exprimés en mg/g de fromage sec à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage. Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, ABCD = consortium reconstitué à partir des isolats identifiés dans le consortium complexe TR15 avec A = 6 bactéries lactiques, B = 7 bactéries non lactiques à Gram positif et catalase positive, C = 3 bactéries à Gram négatif, D = 3 levures.

D'autre part, cette reconstitution confirme la mauvaise implantation des espèces *Cb. mobile* et *Marini. psychrotolerans* sur la croûte des fromages avec le consortium reconstitué ABCD alors que ces deux espèces font partie des flores dominantes en fin d'affinage sur les croûtes des fromages du consortium TR15. Ceci pourrait être attribué soit aux conditions de pré-culture des souches, soit à la dynamique des populations microbiennes dans les consortiums reconstitués. Ces résultats confirment également que le consortium ABCD qui n'intègre pas la diversité des souches, ne reflète peut être pas la composition microbienne du TR15.

C'est pourquoi en parallèle de cette 3^{ème} série de reconstitution, nous avons choisi d'analyser plus finement la composition du consortium TR15 initial sans développement préalable sur croûte par une approche culture dépendante et indépendante.

Milieu d'origine	Groupes RFLP ¹	Nombre d'isolats	Amplification PCR spécifiques des espèces de bactéries lactiques ²										Nombre d'isolats séquencés	Séquence ADNr 16S >99% homologie		
			paracasei	Lp	Lc	Lmn	Lncit	ddlE1	ddlF1	ddlG1	ddlH1	ddlI1				
FH, MSE	G1	14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	6 <i>Lactobacillus casei / paracasei</i>
MSE	G2	7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	1 <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
SB	G3	10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	3 <i>Enterococcus faecalis</i>
CRBM	G4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	5 <i>Carnobacterium mobile</i>
CRBM	G5	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	1 <i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>
CRBM	G6	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase +	1 <i>Arthrobacter arilaitensis</i> 12 <i>Arthrobacter aridleyensis - bergerei</i>
CRBM	G8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	1 <i>Brachybacterium sp., Brachybacterium tyrofermentans</i>
CRBM, RPF	G10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	7 <i>Staphylococcus pulvereri</i> 2 <i>Staphylococcus xylosum</i> ou <i>saprophyticus</i> 1 <i>Staphylococcus equorum</i>
CRBM	G13	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram+ Catalase -	1 <i>Brochothrix thermosphacta</i>
RPF	G9	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram-	1 <i>Proteus vulgaris</i>
PCA+L+CV	G12	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gram-	1 <i>Serratia proteomaculans - liquefaciens</i> 1 <i>Serratia grimesi</i> 1 <i>Enterobacter amnigenus</i>
Nombre total d'isolats		92											45			

Tableau 28 : Affiliation phylogénétique des 92 isolats bactériens issus du consortium TR15.

Identification des bactéries isolées des milieux de culture par analyse RFLP et séquençage des ADNr 16S. La description des milieux de culture est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes. ¹ Profils RFLP analysés à l'aide du logiciel Bionumerics par méthode UPGMA. Les isolats présentant des profils identiques ont été rassemblés dans un même groupe et les ADNr 16S d'un ou plusieurs isolats ont été séquencés. ² La description des amorces est donnée dans le Matériels et Méthodes.

4.4. Identification des isolats du consortium TR15 par méthode culture dépendante et indépendante

4.4.1. Identification des isolats après culture sur milieux gélosés.

Le consortium complexe TR15 issu de la croûte de fromage St Nectaire a été inoculé sur divers milieux plus ou moins sélectifs comme indiqué dans le paragraphe 2.2.1 de la partie Matériels et Méthodes.

L'affiliation phylogénétique des 92 isolats récoltés sur les milieux de culture est répertoriée dans le tableau 28. Ceux-ci se classifient dans les mêmes groupes RFLP que la précédente identification excepté les groupes G7 (*Brevibacterium sp.*) et G11 (*Pseudomonas sp.*) absents de cette identification. Trente et un isolats des groupes G1, G2 et G3 correspondant aux bactéries lactiques ont été identifiés par amplification des ADNr 16S avec des amorces spécifiques d'espèces. Quatorze isolats du G1 ont été assignés à *Lb. casei / paracasei*, 7 isolats du G2 à *Ln. mesenteroides* et les 10 isolats du G3 à *E. faecalis*. Un ou plusieurs isolats des autres groupes ont été identifiés uniquement par séquençage des ADNr 16S. Les ADNr 16S séquencés présentant une homologie supérieure ou égale à 99% correspondaient aux espèces suivantes : *Cb. mobile* (G4, 5 isolats), *Marini. psychrotolerans* (G5, 1 isolat), *A. ardleyensis* ou *bergerei* (G6, 12 isolats), *Brachybacterium tyrofermentans* (G8, 1 isolat), *S. pulvereri* (G10, 7 isolats), *S. xylosus* ou *saprophyticus* (G10, 2 isolats), *Staphylococcus equorum* (G10, 1 isolat), *Brochothrix thermosphacta* (G13, 1 isolat), *Prot. vulgaris* (G9, 1 isolat), *Ser. proteomaculans* (G12, 1 isolat), *Ser. grimesii* (G12, 1 isolat), et *Enterobacter amnigenus* (G12, 1 isolat) (Tableau 28).

La flore microbienne du consortium TR15 est donc très diverse. Les niveaux des flores lactiques *Lactobacillus* (6,4 log UFC/mL), *Leuconostoc* (5,3 log UFC/mL) et *Enterococcus* (4,7 log UFC/mL) sont plus élevés que ceux des flores de bactéries à Gram négatif (4,7 log UFC/mL). Les niveaux de bactéries à Gram positif et catalase positive sont plus difficiles à évaluer en raison de la plus faible sélectivité des milieux de cultures CRBM et RPF (Tableau 29).

Cette deuxième collection de 92 espèces diffère de la 1^{ère} collection constituée après isolement d'isolats issus d'analyse à différents temps d'affinage de croûtesensemencées par TR15. Elle ne contient pas *Brevibacterium* et *Pseudomonas* mais s'est enrichie des espèces *S. equorum*, *Br. thermosphacta*, *Ser. grimesii* et *Enterobacter amnigenus*.

	log CFU/mL
Lactobacilli (FH)	6,4
Enterococci (SB)	4,7
Leuconostocs dextrane +(MSE)	5,3
Bactéries Gram+ (CRBM)	7,0
Staphylocoques (RPF)	4,3
Bactéries Gram- (PCA+L+CV)	4,7
Levures (OGA)	4,8

Tableau 29 : Niveaux des flores microbiennes du consortium complexe TR15

Résultats exprimés par mL de suspension du consortium TR15 préparé comme décrit dans le paragraphe 2.1.1 de la partie Matériels et Méthodes.

	Nombre de clones séquencés (>99% homologie)	Proportion des clones (%)
<i>Psychrobacter aquimaris</i>	15	16
<i>Psychrobacter aquimaris</i> ou <i>glacicola</i>	56	62
<i>Psychrobacter pacificensis</i>	2	2
<i>Psychrobacter celer</i>	5	5
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	8	9
<i>Halomonas variabilis</i> ou <i>alkentartica</i>	1	1
<i>Halomonas sp.</i> ou <i>Gammaproteobacterium sp.</i>	3	3
<i>Serratia proteomaculans</i> ou <i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	1	1
Nombre total de clones	91	

Tableau 30 : Affiliation phylogénétique des 91 clones bactériens issus du consortium TR15

Clonage réalisé suivant les recommandations du fournisseur comme détaillé dans le Matériel et Méthodes. Proportion des espèces identifiées à partir du séquençage des ADNr 16S des 91 clones

4.4.2. Clonage du consortium complexe TR15

Afin de vérifier la présence éventuelle d'espèces non cultivables sur les milieux utilisés (tableau 30), les ADNr 16S amplifiés à partir des ADN totaux extraits directement du consortium TR15 ont été clonés puis séquencés. La totalité des 91 clones séquencés correspondaient à des séquences de bactéries à Gram négatif (tableau 30). Les ADNr 16S des clones séquencés ont été affiliés aux espèces suivantes : *Psychrobacter aquimaris* ou *glacincola* (56 clones soit 62% des clones), *Psychrobacter aquimaris* (15 clones soit 16 % des clones), *Pseudoalteromonas sp.* (8 clones soit 9 % des clones), *Psychrobacter celer* (5 clones soit 5 % des clones), *Psychrobacter pacificensis* (2 clones soit 2 % des clones), *Halomonas sp.* ou *Gammaproteobacterium sp.* (3 clones soit 3% des clones), *Halomonas variabilis* ou *alkentartica* (1 clone soit 1% des clones) et *Ser. proteomaculans* (1 clone soit 1% des clones). Excepté *Ser. proteomaculans* aucune des espèces identifiées par clonage n'a été détectée par méthode culture dépendante malgré l'utilisation de milieux pour la détection des bactéries à Gram négatif. Cependant dans la suite de l'étude, la culture du consortium TR15 sur le milieu BHI a révélé la présence de *Psychrobacter aquimaris*. L'amplification de contaminants est donc peu probable. Cette amplification exclusive des bactéries à Gram négatif est surprenante vu que le niveau des bactéries à Gram positif (7 log UFC/mL) dans le consortium TR15 est supérieur à celui des bactéries à Gram négatif (4,7 log UFC/mL) (tableau 29). La dominance de séquences de bactéries à Gram négatif lors du clonage pourrait résulter d'une mauvaise extraction des ADN totaux des bactéries à Gram positif plus difficiles à extraire que les Gram négatif, d'une amplification préférentielle des ADNr 16S de bactéries à Gram négatif, ou de contamination lors de l'extraction.

A) Aires d'inhibition						
	AI (8-1)	AI (14-8)	AI (18-14)	AI (21-18)	AI (28-21)	Σ AI
TR15	9,22	11,17	8,37	10,89	31,43	71,07
BR	5,52	3,69	1,07	3,38	15,51	29,18
BR+	4,52	2,08	0,95	2,84	13,53	23,91
BHI	8,16	7,42	4,28	7,68	24,94	52,48
ABCD ₂	9,85	8,38	2,98	5,55	18,90	45,65
A(+) _{BCD₂}	8,94	8,27	5,02	7,94	21,99	52,16

B) pH						
	pH j1	pH j8	pH j14	pH j18	pH j21	pH j28
Contrôle	5,35	6,51	7,76	7,29	7,70	7,43
TR15	5,37	5,99	6,97	7,27	7,71	7,80
BR	5,61	6,45	7,07	7,65	7,88	7,53
BR+	5,77	6,51	7,71	7,42	7,80	7,43
BHI	5,52	6,18	7,57	7,65	7,93	7,62
ABCD ₂	5,36	6,79	7,51	7,48	7,73	7,39
A(+) _{BCD₂}	5,91	6,49	5,93	7,35	7,78	7,50

Tableau 31 : Aires d'inhibitions de *L. monocytogenes* et pH des croûtes des fromages inoculés avec le consortium TR15 et les consortiums reconstitués (4^{ème} série de reconstitution)

AI = aires d'inhibition

AI = $(t_2 - t_1) / 2 * [(Ct_2 + Ct_1) - (Tt_2 + Tt_1)]$ avec C = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* dans les fromages contrôle et T = résultats de dénombrements de *L. monocytogenes* dans les fromages inoculés avec les différents consortiums, $(t_2 - t_1)$ = les temps d'affinage.

Fromages inoculés avec les différents consortiums: TR15 = consortium complexe ; BR, BR+, BHI = consortium reconstitués à partir de la récolte de colonies issus de la culture du TR15 sur différents milieux sélectifs ou non sélectif (BHI) ; ABCD₂ et A(+)_{BCD₂} = consortium reconstitué à partir des souches de la 2^{ème} collection identifiées à partir du consortium TR15

	List 14 jours / pH 8 jours	List 18 jours / pH 8 jours	List 21 jours / pH 8 jours	List 28 jours / pH 8jours	List 18 jours / pH 14 jours	List 21 jours / pH 14 jours
Coefficient de corrélation	0,67	0,63	0,57	0,55	0,55	0,52

Tableau 32 : Coefficients de corrélation des valeurs de pH et des niveaux de *L. monocytogenes* durant l'affinage

List = niveau de *L. monocytogenes* à un temps t

4.5. Quatrième série de reconstitution

Elle avait pour objectif de vérifier si l'inhibition est associée à un déficit de souches et d'espèces identifiées dans la 1^{ère} et la 2^{ème} collection par rapport à la première, à un effet souche ou à un déficit initial de lactobacilles et leuconostocs. Pour cela, les croûtes de fromages à 1 jour ont été inoculées avec des consortiums constitués i) avec l'ensemble des colonies issues du consortium complexe TR15 cultivables sur des milieux sélectifs (FH, MSE, SB, CRBM, RPF, PCA+L+CV et OGA) (consortiums BR et BR+) ou non sélectifs (BHI) (consortium BHI), ii) avec les 56 isolats des 1^{ère} et 2^{ème} collections (consortium ABCD₂ et A(+)_{BCD}₂) en faisant varier les niveaux des lactobacilles et des leuconostocs comme il est décrit dans le paragraphe 3.2.2 du Matériels et Méthodes (Tableaux 14 et 15). Comme dans les reconstitutions précédentes les fromages uniquement inoculés avec le ferment commercial (*Penicillium commune*) servait de témoin pour la croissance de *L. monocytogenes* et ceux inoculés avec le consortium complexe TR15 de référence d'inhibition.

4.5.1. Inhibition de *L. monocytogenes* et pH

Comme dans les reconstitutions précédentes le consortium TR15 est le plus inhibiteur pendant tout l'affinage de 1 à 28 jours, comme l'indiquent les aires d'inhibition du tableau 31 A ($\Sigma AI = 71$). Cependant, jusqu'à 8 jours d'affinage, les consortiums reconstitués avec les 56 souches de la deuxième collection aux deux concentrations de bactéries lactiques (ABCD₂ et A(+)_{BCD}₂) et le consortium avec les souches se multipliant sur BHI (consortium BHI) inhibent de façon équivalente au TR15 (8,16 <AI< 9,85) sans aucune croissance de *L. monocytogenes*. Après 18 jours, leur activité anti-listeria est moins importante que celle du consortium TR15 mais ces consortiums BHI et A(+)_{BCD}₂ inhibent encore assez fortement *L. monocytogenes* en particulier après 21 jours d'affinage (21,99 <AI< 24,94). Tout au long de l'affinage, les consortiums BR et BR+, constitués des souches récoltées sur divers milieux (FH, MSE, SB, CRBM, RPF, PCA+L+CV et OGA) sont moins inhibiteurs quel que soit le niveau d'ensemencement en *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus* (AI ≤ 5,52 à 8 jours et 13,53 <AI <15,51 après 21 jours).

Comme dans les reconstitutions précédentes le pH augmente fortement tout au long de l'affinage avec des valeurs comprises entre 5,35 et 5,91 à 1 jour à des valeurs entre 7,39 et 7,80 en fin d'affinage (Tableau 31 B). A un temps donné le niveau de *L. monocytogenes* n'est pas corrélé aux valeurs de pH au même temps. Par contre, les niveaux de *L. monocytogenes* à 14, 18, 21 et 28 jours seraient positivement corrélés aux valeurs de pH à 8 jours ; la plus forte corrélation est notée entre le pH à 8 jours et le niveau de *Listeria* à 14 jours et ($r = 0,67, n=7$), la plus faible avec le niveau à 28 jours ($r = 0,55, n=7$). Les valeurs de pH à 14 jours sont moins

TR15 : n° isolat sur milieu BHI	Gram	Catalase	Séquences des ADNr 16S (homologie >99%)
BHI 3	+	±	Bactéries à Gram positif et catalase positive <i>Carnobacterium maltaromaticum Carnobacterium piscicola</i>
BHI 4	+	-	
BHI 9	+	-	
BHI 11	+	-	<i>Carnobacterium mobile</i>
BHI 22	+	-	
			Bactéries à Gram positif et catalase positive
BHI 1	+	+	<i>Brevibacterium sp. ; Brevibacterium linens, antarcticum, auranticum</i>
BHI 5	+	+	
BHI 6	+	+	
BHI 18	+	+	
BHI 2	+	+	
			<i>Arthrobacter sp. ; Arthrobacter bergerei ; Arthrobacter ardleyensis</i>
BHI 10	+	+	
BHI 12	+	+	
BHI 13	+	+	
BHI 15	+	+	<i>Leucobacter komagatae</i>
BHI 8	+	+	<i>Leucobacter aridicollis, Leucobacter iarius</i>
BHI 23	+	+	
BHI 17	+	+	
BHI 19	+	+	<i>Microbacterium sp., Microbacterium phyllosphaerae, paraoxydans, koreense, foliorum</i>
BHI 20	+	+	
BHI 16	+	+	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
BHI 21	+	+	
			Bactéries à Gram négatif
BHI 7	-	+	<i>Psychrobacter aquimaris</i>
BHI 14	-	+	<i>Serratia proteomaculans</i>

Tableau 33 : Affiliation phylogénétique des 23 isolats bactériens issus de la culture du consortium TR15 sur le milieu BHI.

Identification des bactéries isolées des milieux de culture par morphotype et séquençage des ADNr 16S. La description des milieux de culture est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes

corrélées avec les niveaux de *L. monocytogenes* à 18 ou 21 jours ($r = 0,5$) et après 14 jours les variables pH aux temps t et les niveaux de *L. monocytogenes* aux temps suivants ne sont plus corrélés (Tableau 32).

Le pH pourrait donc contribuer à l'inhibition mais représenterait plutôt un indicateur car la croissance de *L. monocytogenes* en surface des fromages est peu influencée à des valeurs de pH supérieures à 5,32 (Saubusse, 2007).

4.5.2. Identification des espèces bactériennes se développant sur le milieu BHI

Comme le consortium BHI composé de l'ensemble des colonies se multipliant sur le milieu BHI après ensemencement du TR15 était parmi les plus inhibiteurs des consortiums reconstitués, nous avons identifié par séquençage des ADNr 16S, 23 isolats issus de ce milieu (tableau 33).

Parmi 23 isolats, 5 isolats appartiennent au groupe des bactéries lactiques avec *Carnobacterium maltaromaticum* / *piscicola* (1 isolat) et *Carnobacterium mobile* (4 isolats). Seize isolats sont des bactéries à Gram positif et catalase positive et identifiés comme : *Brevibacterium linens* / *auranticum* / *antarticum* (4 isolats), *Arthrobacter bergerei* / *ardleyensis* (4 isolats), *Microbacterium sp.* (3 isolats), *Leucobacter komagatae* (1 isolat), *Leucobacter aridicollis* / *iaris* (2 isolats), *Brochothrix thermosphacta* (2 isolats). Enfin 2 isolats sont des bactéries à Gram négatif : *Psychrobacter aquimaris* et *Serratia proteomaculans*. Ces deux espèces ont été identifiées dans les clones issus du clonage de TR15 dont la grande majorité étaient identifiés comme *Psychrobacter aquimaris*. Par contre, *Brevibacterium*, *Microbacterium sp.* et *Leucobacter sp.* n'avaient pas été identifiés lors de la constitution de la 2^{ème} collection d'isolats issus du consortium TR15.

Le devenir de ces espèces sur la croûte des fromages inoculée avec le consortium BHI a été analysé par dénombrements des grands groupes microbiens, analyse SSCP et identification d'isolats sur les milieux CRBM et BHI (+inhibiteurs des bactéries à Gram négatif, levures et moisissures) comme il sera développé dans le paragraphe 4.5.3.

4.5.3. Evolution des flores microbiennes au cours de l'affinage

Excepté la flore *Lactobacillus* qui augmente tout au long de l'affinage, la plupart des flores microbiennes se développent fortement entre 1 et 8 jours. Le temps 28 jours est également un indicateur reflétant l'évolution entre 8 et 28 jours d'affinage. C'est pourquoi nous avons sélectionné les niveaux de flores sur différents milieux aux temps 8 et 28 jours pour la comparaison des communautés microbiennes des croûtes de fromages (tableau 34).

	pH		<i>Lactobacillus</i> (FH)		<i>Leuconostoc</i> (MSE)		<i>Enterococcus</i> (SB)		<i>Brachybacterium</i> sp. (CRBM)		<i>S. pulvereri</i> (CRBM)		Bactéries lactiques (CRBM)		Bactéries à Gram négatif (PCA+L+CV)		Levures (OGA)	
	j8	j28	j8	j28	j8	j28	j8	j28	j8	j28	j8	j28	j8	j28	j8	j28	j8	j28
Contrôle	6,51	7,43	<2	<2	<2	<2	<2	<2	3,3	<2	3,9	7,3	<2	<2	<2	<2	<2	<4,7
TR15	5,99	7,80	6,6	7,6	8,0	7,6	6,0	6,9	5,7	6,9	6,3	4,6	8,6	7,3	8,3	8,6	8,4	7,1
BR	6,45	7,53	5,0	7,2	7,2	7,4	4,0	6,9	7,7	8,5	9,1	7,2	<4	9,0	7,5	9,3	8,7	7,5
BR+	6,51	7,43	6,2	7,9	8,5	7,1	5,0	7,7	6,7	8,4	8,8	7,9	<4	8,7	5,4	9,6	8,3	7,9
BHI	6,18	7,62	2,0	<4	4,1	<4	5,8	7,2	5,8	5,7	4,7	<2	7,1	7,5	8,6	9,4	7,0	7,2
ABCD ₂	6,79	7,39	5,1	7,2	6,4	6,0	3,4	7,9	6,2	9,2	7,2	8,1	5,8	8,1	7,0	8,9	8,0	8,2
A(+) _{BCD₂}	6,49	7,50	6,1	6,6	5,2	7,8	3,8	8,0	5,9	8,8	6,3	6,8	<2	8,0	4,4	9,3	7,5	8,3

Tableau 34 : pH et Niveaux des flores à 8 et 28 jours d'affinage sur les croûtes des fromages de la 4^{ème} série de reconstitution

Niveaux de flores exprimés en log UFC/cm². Les niveaux de flores en dessous de la limite de détection de 2 log UFC/cm² sont indiqués <2. Fromages inoculés avec les différents consortiums: TR15 = consortium complexe ; BR, BR+, BHI = consortium reconstitués à partir de la récolte de colonies issus de la culture du TR15 sur différents milieux sélectifs comme décrit dans le paragraphe... du Matériels et Méthodes ; ABCD₂ et A(+)_{BCD₂} = consortium reconstitué à partir des 56 souches de la 2^{ème} collection identifiées à partir du consortium TR15

Les croûtes de fromageensemencées avec le consortium BHI, se caractérisent par les niveaux les plus faibles en *Lactobacillus* à 8 jours (2 log UFC/cm²) et 28 jours (<4 log UFC/cm²), en *Leuconostoc* producteurs de dextrans (<4 Log UFC/cm² à 28 jours), en bactéries d'affinage (*Arthrobacter/ Brachybacterium sp.* à 5,8 log UFC/cm²) et en levures (~ 7 log UFC/cm²) mais les plus forts niveaux de bactéries à Gram négatif (>8 log UFC/cm² dès 8 jours). Malgré ce faible niveau de *Lactobacillus*, leur pH à 8 jours est plus faible que ceux des croûtes avec les autres consortiums (Tableau 34). De plus, une majorité de flores de bactéries lactiques sont dénombrées à 8 jours (6,5 log UFC/cm²) sur le milieu CRBM. En effet, l'identification des flores sur le milieu CRBM révèle la dominance de *Brochothrix thermosphacta* (91% des isolats identifiés) et la présence des flores *E. faecalis* et *Marini. psychrotolerans* représentant chacune 3% des isolats à 8 jours (tableau 35). La flore *Arthrobacter / Brachybacterium* représente également 3% des isolats du milieu avec un niveau de 5,6 log UFC/cm². Sur un milieu BHI additionné d'inhibiteurs de bactéries à Gram négatif, levures et moisissures, les bactéries lactiques dominent largement à 8 jours avec *Cb. maltaromaticum* (54% des isolats) et *Enterococcus sp.* (29 % des isolats). Sur le milieu CRBM, à 28 jours d'affinage, la proportion de *Br. thermosphacta* diminue au profit de *Marini. psychrotolerans* (81% des isolats), *Cb. mobile* (6% des isolats) et *E. faecalis* (6% des isolats) tandis que sur le milieu BHI (avec inhibiteurs de Gram négatifs, levures et moisissures), *Cb. maltaromaticum* (47% des isolats) et *E. faecalis* (24% des isolats) dominent toujours et *Leucobacter aridicollis* ou *iarius* est détecté (6 % des isolats) (tableaux 34 et 35). *Vagococcus fluvialis* et *E. gilvus* sont détectés sur le milieu BHI (+inhibiteurs) alors qu'ils n'avaient pas été identifiés dans l'inoculum BHI de départ.

Les niveaux de flores sur le milieu CRBM, BHI (+inhibiteurs) et les résultats de l'analyse SSCP de la région V2 des croûtes de fromages inoculées avec le consortium BHI concordent. En effet, un pic co-éluant avec *S. pulvereri/ Brochothrix thermosphacta* domine en début d'affinage et un pic de *Cb. mobile* (3% des pics du profil) est détecté. Le pic *S. pulvereri/ Brochothrix thermosphacta* correspondrait plutôt à *Br. thermosphacta* car *S. pulvereri* aux colonies caractéristiques n'est pas dénombré. Tout au long de l'affinage la proportion de ce pic diminue au profit de ceux éluant avec *Enterococcus* (10% des pics du profil), *Arthrobacter* (11%), *Leucobacter* (45%) (Figure 12).

Les croûtes de fromages TR15 se distinguent, à 8 jours d'affinage, par des niveaux de *Leuconostoc* producteurs de dextrans (8 log UFC/cm²), de bactéries à Gram négatif (8,3 log UFC/cm²), de *Lactobacillus* (6,6 log UFC/cm²), d'*Enterococcus* (6 log UFC/cm²) et de levures (8,4 log UFC/cm²) plus élevés que sur les croûtes avec les autres consortiums. Comme pour le consortium BHI, à 8 jours, la flore dénombrée sur le milieu CRBM est dominée par

Milieu	Espèces	TR15			BHI				
		j8	j28	j8	j8	j28	j28		
		%	log UFC/cm ²	%	log UFC/cm ²	%	log UFC/cm ²		
CRBM	Flore bactéries lactiques	-	8,6	-	7,9	-	7,1	7,5	
	<i>Carnobacterium mobile</i>	-	-	6	6,9	-	-	5,7	
	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	-	-	38	7,7	3	5,6	6,8	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	7	5,7	-	-	3	5,6	-	
	<i>Staphylococcus pulverei / vitulinus</i>	29	6,3	6	6,9	-	-	-	
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	57	6,6	-	-	91	7,1	5,7	
	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	-	-	25	7,5	-	-	5,7	
	<i>Brevibacterium linens / aurantiacum</i>	-	-	25	7,5	-	-	-	
	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	7	5,7	-	-	3	5,6	-	
BHI (+ acide nalidixique) ¹ (+ pimarcine) ²	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	nd	nd	37,5	5,4	54	7,4	47	7
	<i>Enterococcus faecalis</i>	nd	nd	-	-	4	6,2	-	-
	<i>Enterococcus gilvus</i>	nd	nd	25	5,1	25	7	24	6,7
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	nd	nd	-	-	8	6,5	24	6,7
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	nd	nd	37,5	5,4	4	6,2	-	-
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	nd	nd	-	-	4	6,2	-	-
	<i>Leucobacter aridicollis / iarius</i>	nd	nd	-	-	-	-	6	6,1

Tableau 35 : Proportions des espèces détectées sur les milieux CRBM et BHI inoculés avec les croûtes des fromages TR15 et BHI à 8 et 28 jours.

Identification de 137 isolats issus des milieux de dénombrements CRBM et BHI des croûtes des fromages inoculés avec les consortiums TR15 et BHI à 8 et 28 jours. Les 137 clones ont été conservés sur clone saver puis identifiés par séquençage des ADNr 16S. 1 acide nalidixique = inhibiteur de bactéries à Gram négatif, 2 pimarcine = inhibiteur des levures et moisissures. - espèce non détectée. nd non déterminé.

Br. thermosphacta (57% des isolats) (tableau 35). Par contre, *S. pulvereri* est détecté (29 % des isolats, 6,3 log UFC/cm²) et *Brachybacterium tyrofermentans* représente 7% des isolats (tableaux 34 et 35). En cours d'affinage, les niveaux de *S. pulvereri* et des levures diminuent fortement pour atteindre à 28 jours des niveaux de 1 à 2 log UFC/cm² inférieurs à ceux de 8 jours. En effet, à 28 jours les espèces de *Marini. psychrotolerans* (38 % des isolats), *A. arilaitensis* (25% des isolats) et *B. linens* ou *aurantiacum* (25% des isolats) dominent sur le milieu CRBM (tableau 35). Sur le milieu BHI à 28 jours, seules des espèces de bactéries lactiques sont détectées : *Cb. maltaromaticum*, *Enterococcus gilvus* et *Ln. mesenteroides*. L'analyse des profils SSCP de la région V2 des ADNr 16S des croûtes des fromages TR15 confirme la dominance de *Ln. mesenteroides* (42%) et de *S. pulvereri/ Br. thermosphacta* (53%) notée lors de la 3^{ème} série de reconstitution (figure 12B). A 28 jours, ces 2 pics dominant toujours mais, des pics éluant avec *Cb. mobile* (8%), *E. faecalis* (7%) et *Lb. casei/paracasei* (14%) sont également présents corroborant ainsi les résultats sur milieux.

Les croûtesensemencées avec les deux consortiums BR et BR+ se caractérisent par des niveaux élevés en flores d'affinage *Arthrobacter* (entre 6 et 7,7 log UFC/cm²) et surtout *S. pulvereri* (entre 8,8 et 9,1 log UFC/cm²) qui est la population dominante à 8 jours d'affinage (tableau 34). Sur ces croûtes, les levures atteignent dès 8 jours les niveaux plus élevés (8,7 log UFC/cm²) alors que les bactéries à Gram négatif et entérocoques ne se développent qu'après 8 jours. L'inoculation de deux niveaux de bactéries lactiques pour ce consortium s'est effectivement traduite par des niveaux plus élevés en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* à 8 jours. En fin d'affinage, les flores *Arthrobacter / Brachybacterium* et *S. pulvereri* se maintiennent à des niveaux élevés et la proportion des bactéries à Gram positif et catalase négative sur le milieu CRBM à 28 jours d'affinage augmente (tableau 34). Les profils SSCP des croûtes BR sont dominés par deux pics éluant avec *Ln. mesenteroides* (9 à 36%) et *Leucobacter aridicollis/iarius* (25 à 66%) tout au long de l'affinage. A faible inoculation de bactéries lactiques la proportion du pic d'*Arthrobacter* (54% à 28 jours) augmente en cours d'affinage alors qu'à forte inoculation de *Lactobacillus* et *Leuconostoc* celle du pic d'*E. faecalis* (40% à 28 jours) augmente (figure 12 D et E).

Les croûtesensemencées par les consortiums ABCD₂ et A(+)BCD₂ se distinguent des autres par le fort développement d'*Arthrobacter* (Δ log = 3 entre 8 et 28 jours) et des bactéries à Gram négatif après 8 jours d'affinage, et le maintien d'un niveau élevé de levures tout au long de l'affinage (>8 log UFC/cm²). Les niveaux de *Lactobacillus* sont similaires à ceux notés avec le consortium BR avec des niveaux plus élevés à 8 jours après forte inoculation (tableau

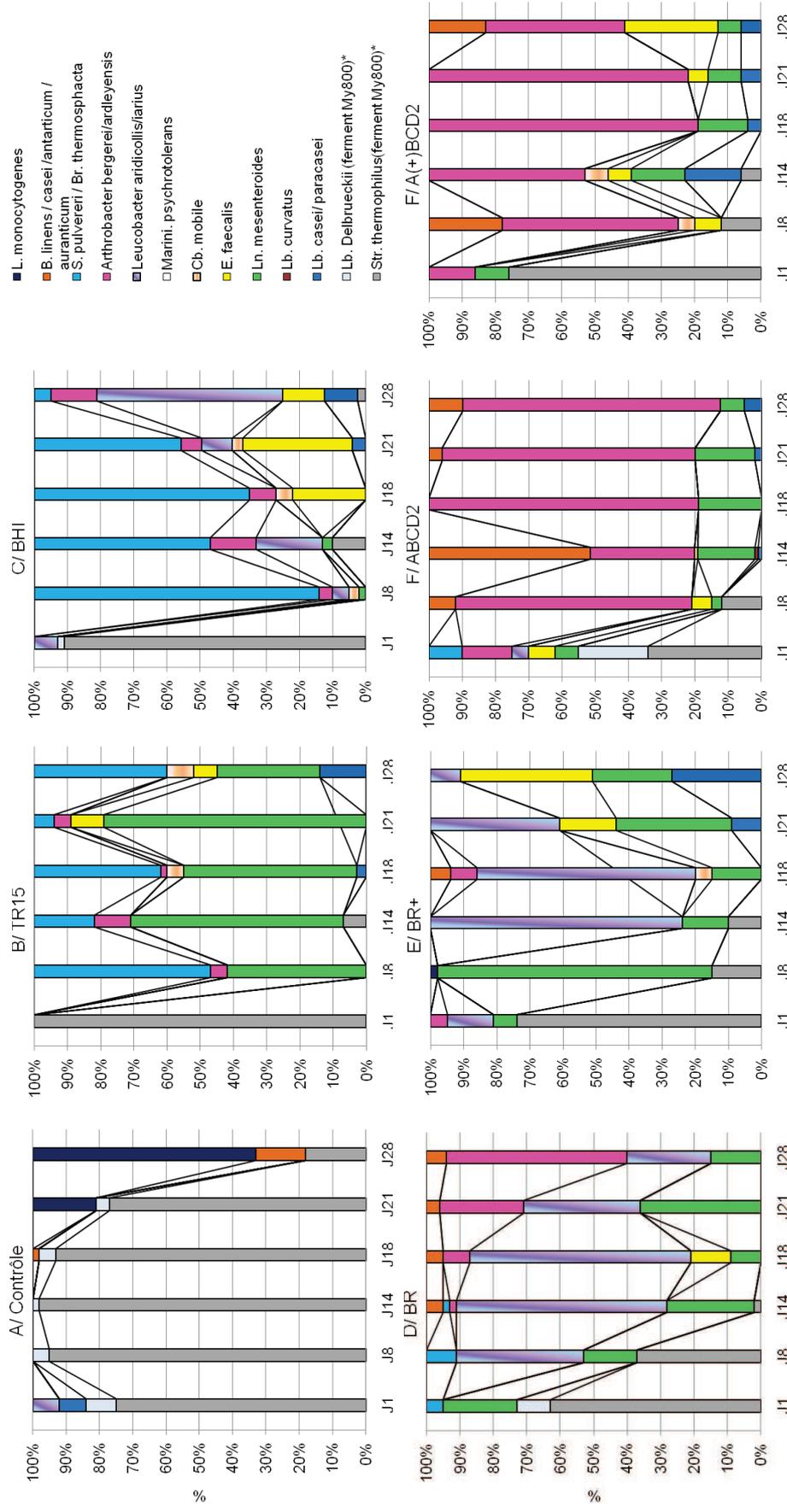


Figure 13 : Proportion des pics SSCP des croûtes des fromages (4^{ème} série de reconstitution)

Proportion P_i de chaque pic du profil obtenu à partir de l'analyse SSCP de la région V2 (brin Hex) des ADN totaux des croûtes de fromages à 8, 14, 18, 21 et 28 jours avec $P_i = a_i * 100 / \sum a_i =$ aire du pic et $\sum a_i =$ somme des aires des pics du profil. Seules les espèces détectées et dominantes aux différents temps d'affinage sont présentées. Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : A/ Contrôle = ferment de surface commercial, B/ TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, D/ BR, E/ BR+, C/ BHI = consortium reconstitués à partir de la récolte de colonies issues de la culture du TR15 sur différents milieux sélectifs ; F/ ABCD₂ et G/ A(+)/BCD₂ = consortium reconstitué à partir des 56 souches identifiées à partir du consortium TR15.

34). Par contre les niveaux de *Leuconostoc* et *Enterococcus* plus faibles à 8 jours d'affinage, atteignent des niveaux plus élevés à 28 jours d'affinage. La forte inoculation de bactéries lactiques ralentirait le développement des bactéries à Gram négatif.

Enfin, comme il était prévisible d'après les niveaux de flores sur milieux, le pic d'*Arthrobacter* domine les profil SSCP des croûtes des fromages ABCD₂ et A(+)₂BCD₂ (de 14% en début d'affinage à 81% à 18 jours) mais le pic *Ln. mesenteroides* représente de 7 à 19% des profils (figure 12 F et G). A noter que sur ces profils des pics correspondant à *Cb. mobile* ou *Brevibacterium* sont ponctuellement détectés.

L'ensemble des résultats sur l'évolution des flores permet de dégager des points communs sur la dynamique des flores sur les croûtes des fromages inoculées avec les consortiums TR15 ou BHI. En effet, les communautés microbiennes se caractérisent par la présence d'espèces peu fréquentes dans les produits laitiers : *Cb. mobile*, *Cb. maltaromaticum*, *Marini. psychrotolerans* et *Br. thermosphacta*. Ces espèces sont absentes ou uniquement ponctuellement présentes sur les croûtes des fromages inoculées avec les autres consortiums moins inhibiteurs. De plus, les croûtes des fromages TR15 et BHI se distinguent par des niveaux en levures plus faibles que pour les autres consortiums. Les autres consortiums reconstitués moins inhibiteurs sont caractérisés par la dominance d'*Arthrobacter*, *S. pulvereri* ou *Leucobacter* tout au long de l'affinage.

4.5.4. Concentrations en acides organiques et sucres à la surface des fromages

Les concentrations en acide citrique sont assez similaires sur toutes les croûtes de fromages jusqu'à 14 jours d'affinage. Elles augmentent entre 14 et 18 jours pour les fromages contrôle, TR15 et A(+)₂BCD₂ puis diminuent (figure 13 A). La diminution est particulièrement importante sur les croûtes avec TR15 après 21 jours puisque cet acide n'est plus quantifié à 28 jours d'affinage. L'acide succinique est produit en faible quantité sur les croûtes des fromages contrôle, ABCD₂ et A(+)₂BCD₂ (<1 mg/g). Sa concentration augmente après 21 jours sur les croûtes avec les autres consortia BR, BR+, BHI et TR15 (figure 13 E). Les concentrations en acide lactique augmentent entre 8 et à 14 jours sur les croûtes de fromagesensemencées avec les consortia TR15, BR et A(+)₂BCD₂ puis diminuent jusqu'à 28 jours d'affinage. Elles diminuent tout au long de l'affinage sur la croûte des fromages avec les autres consortia. Les différences dans les niveaux d'acide lactique sont plus importantes à 14 jours et dans une moindre mesure à 18 jours. A ce stade les concentrations sont les plus fortes sur les croûtes avec TR15 (19,40 mg/g), les plus faibles sur les fromages avec ABCD₂ (6,20 mg/g),

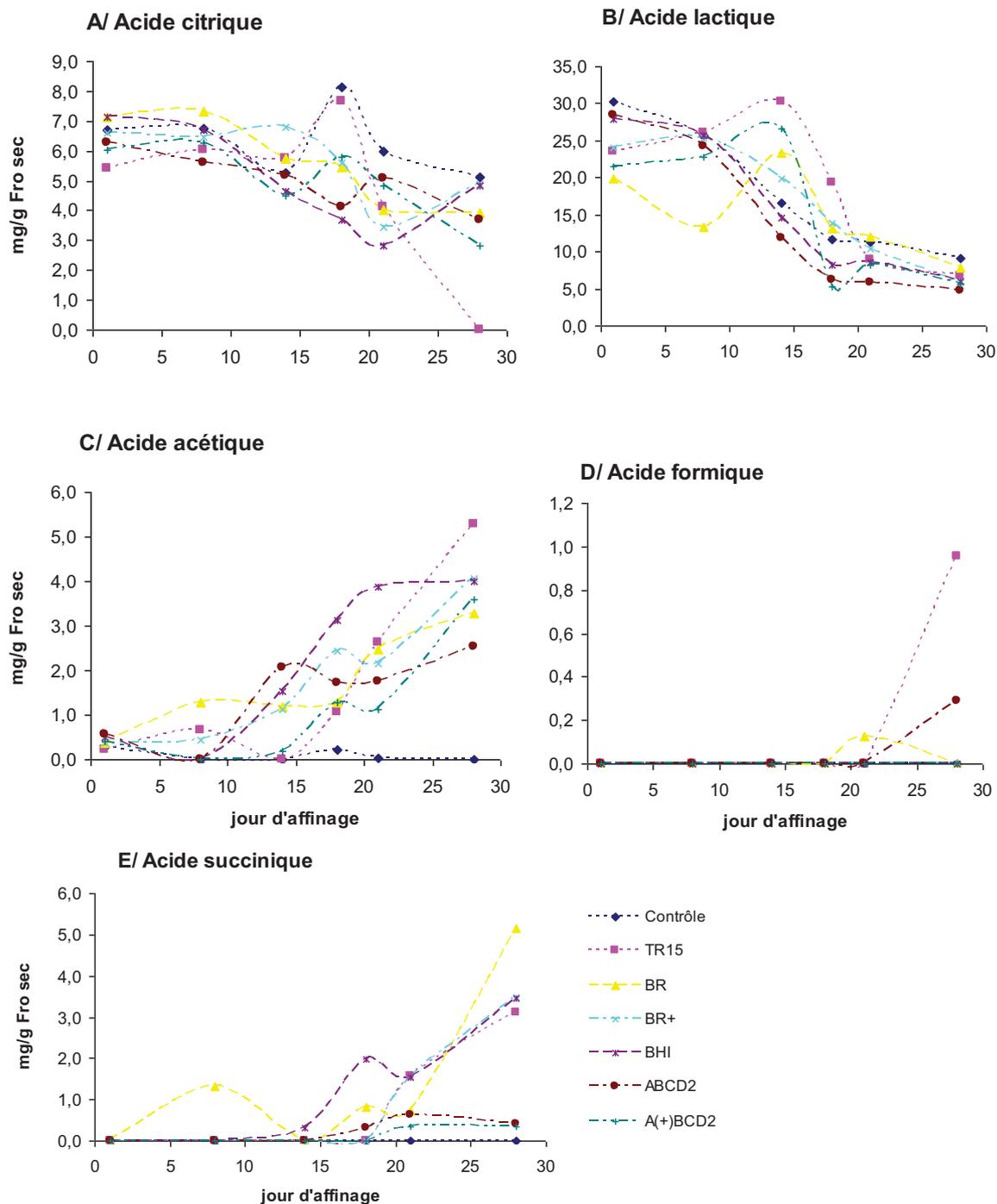


Figure 14 : Concentrations en acides organique à la surface des fromages inoculés avec le consortium complexe TR15 et les consortiums reconstitués (4^{ème} série de reconstitution)

Dosages réalisés par méthode HPLC à 1, 8, 11, 14, 18, 21 et 28 jours d'affinage. Résultats exprimés en mg/g de croûte de fromage sec (mg/g Fro sec). Les surfaces des fromages ont été co-inoculées avec *L. monocytogenes* et les différents consortiums : Contrôle = ferment de surface commercial, TR15 = consortium complexe issu de la croûte du fromage de la première campagne de collecte, BR, BR+, BHI = consortium reconstitués à partir de la récolte de colonies issus de la culture du TR15 sur différents milieux sélectifs ; ABCD₂ et A(+)-BCD₂ = consortium reconstitué à partir des 56 souches identifiées à partir du consortium TR15.

A(+) BCD_2 (5,27 mg/g) et BHI (8,15 mg/g) (figure 13B). Les concentrations en acide acétique augmentent au cours de l'affinage pour tous les fromages excepté le contrôle.

A 18 et 21 jours elles sont les plus importantes sur les croûtes avec BHI (3,13 et 3,86 mg/g) et les plus faibles avec A(+) BCD_2 (1,27 et 1,14 mg/g). A 28 jours, elles sont les plus fortes sur les croûtes TR15 (5,29 mg/g), les plus faibles sur ABCD₂ (2,53 mg/g) et BR (3,28 mg/g) à faibles niveaux de bactéries lactiques. L'acide formique n'est pas détecté au cours de l'affinage si ce n'est de faibles concentrations pour les consortia TR15 et ABCD₂ à 28 jours.

4.5.5. Corrélations entre les variables

Les niveaux en *L. monocytogenes* et les concentrations en acide lactique à 14 jours sont négativement corrélées ($r = -0,55$). La production d'acide lactique à 14 jours serait associée aux niveaux les plus élevés en *Lactobacillus* ($r = 0,63$) et *Leuconostoc* ($r = 0,64$). Après 14 jours, l'inhibition de *L. monocytogenes* n'est plus corrélée aux concentrations en acide lactique. En effet, à 28 jours, les niveaux de levures, de bactéries à Gram négatif ou des *Arthrobacter* sont négativement corrélés à la concentration en acide lactique ($r = -0,86$, $r = -0,73$, $r = -0,80$). Ces groupes microbiens pourraient consommer l'acide lactique ou seraient sensibles à cet acide. Les concentrations en acide acétique sont négativement corrélées au niveau de *L. monocytogenes* à 21 jours ($r = -0,60$) et 28 jours ($r = -0,95$). Elles seraient associées aux bactéries à Gram négatif à 21 jours ($r = 0,72$) et 28 jours ($r = 0,85$) mais aussi aux *Lactobacillus* ($r = 0,70$), *Leuconostoc* ($r = 0,71$) et *Enterococcus* ($r = 0,79$). A 28 jours, les concentrations d'acide citrique sont positivement corrélées aux niveaux de *L. monocytogenes* ($r = 0,65$) et négativement corrélées aux niveaux en *Lactobacillus* ($r = -0,50$) et *Leuconostoc* ($r = -0,60$) (tableau 36).

Afin de préciser les relations entre production d'acides et flores microbiennes, les potentialités de production à partir du lactose, glucose, galactose et citrate de 19 souches du consortium TR15 ont été étudiées sur un milieu fromage. Les 19 souches choisies sont issues des collections de souches du consortium TR15 utilisées pour reconstituer les consortiums.

4.5.6. Potentialités des souches utilisées pour reconstituer des consortiums à produire des acides organiques à partir de différents substrats

Les résultats de production des différents acides organiques en présence de glucose, galactose, lactose ou de citrate sont répertoriés dans le tableau 37.

De manière générale, les souches de bactéries lactiques ont une croissance plus faible sur le milieu fromager (de 6,2 à 8,5 log UFC/g) que les bactéries à Gram positif et catalase positive

	acide lactique j14	acide lactique j21	acide lactique j28	acide acétique j8	acide acétique j14	acide acétique j21	acide acétique j28	acide citrique j21	acide citrique j28
<i>L. monocytogenes</i> j14	-0,55								
<i>L. monocytogenes</i> j18									
<i>L. monocytogenes</i> j21		0,58	0,61			-0,60	-0,95	0,44	0,65
<i>L. monocytogenes</i> j28				0,51					
<i>Lactobacillus</i> j8									
<i>Lactobacillus</i> j14	0,63				0,21				
<i>Lactobacillus</i> j21		-0,42				0,26		-0,27	
<i>Lactobacillus</i> j28			-0,57				0,70		-0,50
<i>Leuconostoc</i> j14	0,60				0,26				
<i>Leuconostoc</i> j18									
<i>Leuconostoc</i> j21		-0,28				-0,28		-0,13	
<i>Leuconostoc</i> j28			-0,53				0,71		-0,60
<i>E. faecalis</i> j14	0,13				0,64				
<i>E. faecalis</i> j18									
<i>E. faecalis</i> j21		-0,58				0,50		-0,50	
<i>E. faecalis</i> j28			-0,86				0,79		-0,30
<i>Arthrobacter sp. / Brachybacterium sp.</i> j18									
<i>Arthrobacter sp. / Brachybacterium sp.</i> j28			-0,80				0,65		-0,24
<i>S. pulvereri</i> j8				0,77					
Bactéries Gram négatif j8				0,53					
Bactéries Gram négatif j14	0,05				0,75				
Bactéries Gram négatif j18									
Bactéries Gram négatif j21		-0,61						-0,68	
Bactéries Gram négatif j28			-0,73			0,72			-0,26
Levures j8				0,78					
Levures j14	0,41				0,52				
Levures j18									
Levures j21		-0,47				0,39		-0,38	
Levures j28			-0,86				0,67		-0,25

Tableau 36 : Coefficients de corrélation entre les niveaux de flores et les quantités d'acides organiques au différents temps d'affinage

et aux bactéries à Gram négatif (de 7,9 à 10,9 UFC/g). La souche *Str. thermophilus* du ferment utilisé pour la fabrication produit uniquement de l'acide lactique à partir du lactose. *Lb. casei/paracasei*, *Lb. curvatus* et *Ln. mesenteroides* produisent de l'acide lactique dans le milieu complété en lactose, glucose, galactose et citrate. Par contre, *E. faecalis* n'en produit qu'à partir du lactose et glucose, *Cb. maltaromaticum* qu'à partir du lactose, glucose, galactose et *Brochothrix thermosphacta* à partir du glucose et galactose. Les plus fortes quantités sont produites par *Ln. mesenteroides* à partir du glucose (1729 mg/L) et *Lb. casei/paracasei* à partir du glucose (1440 mg/L), galactose (1270 mg/L) et lactose (1130 mg/L). Les pH les plus faibles sont obtenus en présence de glucose pour toutes les souches. Aucune espèce de bactéries à Gram négatif ne produit d'acide lactique et parmi les bactéries à Gram positif et catalase positive, seule *Brachybacterium tyrofermentans* métabolisme le lactose et le glucose en acide lactique.

Quel que soit le milieu, les bactéries lactiques *Lb. casei/paracasei*, *Ln. mesenteroides*, *E. faecalis*, *Cb. maltaromaticum*, *Cb. mobile* et *Br. thermosphacta* produisent de l'acide acétique excepté *Lb. curvatus* qui n'en produit pas. La plus forte quantité est produite par *E. faecalis* sur milieu citrate (1236 mg/L). Parmi les bactéries Gram négatif, *Pseudomonas* produit de l'acide acétique dans tous les milieux, *Prot. vulgaris* à partir du glucose et du citrate. L'acide acétique est également produit par *Brachybacterium tyrofermentans* dans tous les milieux enrichis en sucre ou citrate, par *Brachybacterium sp.* et *Brevibacterium* à partir du citrate, par *S. pulvereri* dans le milieu de base et les milieux enrichis en glucose et galactose.

Les espèces de bactéries à Gram négatif testées, *Br. thermosphacta*, *A. nicotianae* et les deux espèces de *Brachybacterium* ne produisent pas d'acide formique. Cet acide est produit en faible quantité par les autres espèces de bactéries lactiques mais aussi par *S. pulvereri*, *B. linens* et *B. antiquum*, le plus souvent même dans le milieu de base. *Lb. curvatus* en produit dans tous les milieux alors qu'aucune production n'est notée dans les milieux enrichis en glucose, galactose ou lactose pour *Lb. casei*, *Ln. mesenteroides*, *S. pulvereri* et les espèces de *Brevibacterium*.

Les valeurs de pH des milieux ne sont pas corrélées à la production d'acides. Les plus faibles valeurs de pH dans les milieux avec sucre sont associées avec la production d'acide lactique ou acétique par les bactéries lactiques. Par contre les valeurs de pH du milieu citrate ne sont pas corrélées à la production d'acide acétique. Les valeurs de pH sont les plus élevées dans les milieuxensemencés avec les bactéries à Gram négatif et certaines bactéries d'affinage qui ne produisent pas d'acide lactique.

Milieu fromager *		<i>Str. thermophilus</i> (MY800) *	<i>Lb. casei/parcasei</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Ch. mobile</i>	<i>Cb. maltaromaticum</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	<i>Brachybacterium sp.</i>	<i>S. pulverei</i>	<i>B. linens</i> ou <i>casei</i>	<i>B. antiquum</i> ou <i>casei</i>	<i>A. nicotianae/arlatensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ou <i>svringae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Psychrobacter aquimaris</i>	<i>Ser. proteomaculans</i>	<i>Ser. proteomaculans/ liquefaciens</i>
log UFC/g	MF	nd	7,4	6,6	7,1	7,6	8,0	7,6	8,3	7,9	8,7	9,2	9,5	9,2	9,7	9,9	9,5	9,1	9,8	10,0
	MF + glucose	nd	8,2	6,2	7,2	7,9	8,1	7,4	8,9	9,0	9,5	9,0	9,5	9,4	9,8	9,9	9,6	8,9	10,9	10,2
	MF + galactose	nd	8,3	6,6	7,3	8,5	8,3	8,1	8,1	8,7	9,6	9,4	9,6	9,4	9,8	9,9	9,8	9,1	10,0	10,2
	MF + lactose	nd	8,4	6,6	7,5	7,9	8,6	7,7	8,3	9,1	9,6	9,2	9,5	9,3	9,8	9,8	9,5	9,1	9,9	10,2
	MF + citrate	nd	7,4	6,7	7,0	7,5	8,2	7,8	8,3	8,6	8,3	9,2	6,1	9,3	9,6	9,8	8,7	9,1	9,8	10,0
pH	MF	6,47	6,53	6,26	6,75	6,79	6,95	6,77	6,71	6,79	7,67	7,89	7,95	7,96	8,53	8,49	7,77	7,78	7,56	8,14
	MF + glucose	6,42	4,64	5,03	5,20	4,33	5,09	4,18	5,46	5,15	6,65	6,73	7,74	7,69	8,52	8,48	5,14	6,07	8,18	7,70
	MF + galactose	6,46	4,77	5,32	6,53	4,75	5,38	4,59	6,67	4,71	6,64	7,45	7,66	7,78	8,52	8,48	6,96	6,55	7,96	7,60
	MF + lactose	4,48	4,83	5,18	6,10	4,40	5,34	4,56	6,76	5,07	6,87	7,94	7,93	7,9	8,50	8,34	7,79	7,32	7,60	7,69
	MF + citrate	6,74	6,72	6,55	6,85	7,83	7,87	6,88	6,81	8,15	7,35	8,27	7,09	7,06	8,56	8,70	7,19	7,72	8,71	8,42
Acide lactique (mg/L)	MF	nd	30	0	75	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MF + glucose	0	1440	343	1729	438	0	392	203	313	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MF + galactose	0	1270	252	252	0	0	46	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MF + lactose	466	1130	273	558	718	0	181	0	144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MF + citrate	0	60	47	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acide acétique (mg/L)	MF	nd	0	6	136	18	38	26	146	0	0	168	47	0	0	60	0	114	0	0
	MF + glucose	9	50	0	121	70	79	113	411	76	0	110	0	0	0	70	327	0	0	0
	MF + galactose	7	150	0	107	120	77	107	123	159	0	109	60	0	0	80	0	0	0	0
	MF + lactose	8	80	0	104	25	83	88	131	96	0	0	43	0	0	70	0	0	0	0
	MF + citrate	0	290	14	59	1236	166	15	92	1680	156	0	0	190	0	70	358	0	0	4
Acide formique (mg/L)	MF	0	10	51	11	53	35	25	0	0	0	15	27	0	0	0	0	0	0	0
	MF + glucose	0	0	67	0	57	24	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MF + galactose	0	0	64	0	51	23	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
	MF + lactose	0	0	58	0	95	21	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0
	MF + citrate	0	10	18	0	0	0	18	0	0	0	10	19	24	0	0	0	0	0	0

Tableau 37 : Potentiel de croissence, de modification du pH et de production d'acides organiques des souches sur un milieu fromager

Dosages des acides organiques par HPLC après culture sur le milieu fromager (cf. paragraphe 6 de la partie Matériels et Méthodes). * MF = Milieu fromager complétement ou non avec 2g/L de glucose, galactose, lactose ou citrate. * *Str. thermophilus* (MY800) souche du ferment commercial utilisé pour la fabrication des fromages. nd non déterminé

Ces résultats confortent les corrélations entre production des acides et les niveaux des flores microbiennes établies dans le paragraphe 4.5.5.

Ainsi, les lactobacilles et leuconostocs auraient un rôle important dans la production d'acide lactique. De même, les bactéries lactiques et les bactéries à Gram négatif participeraient à la production d'acide acétique soit à partir des sucres soit à partir du citrate. Il est probable que *Carnobacterium* et *Brochothrix* soient impliqués dans la production même si aucune corrélation n'avait été mise en évidence faute d'une quantification systématique des espèces. Les espèces de bactéries à Gram positif et catalase positive dominantes dans les communautés (*S. pulvereri*, *Arthrobacter*) ne contribueraient pas à la production d'acides.

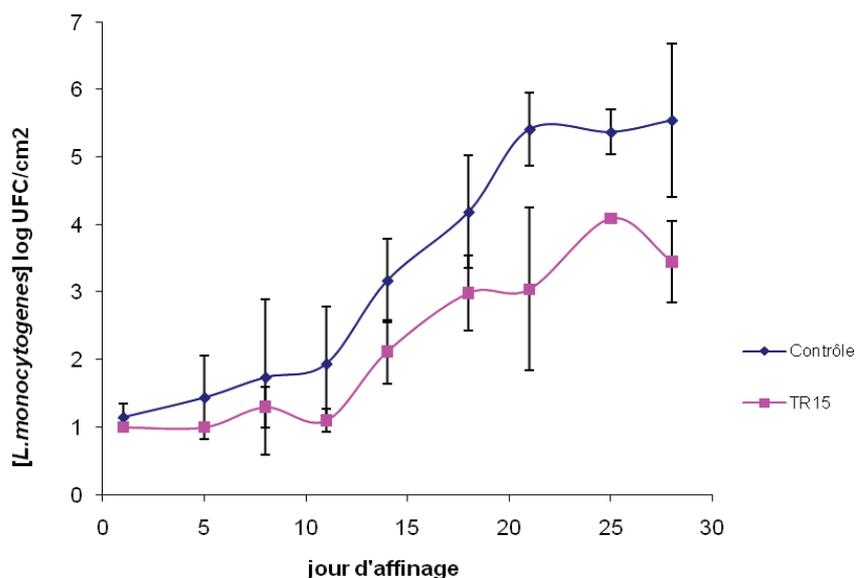


Figure 15 : Niveaux de *L. monocytogenes* à la surface des fromages inoculés avec le consortium complexe TR15 ou *Penicillium commune*

Niveaux de *L. monocytogenes* à la surface des fromages. Moyennes et écarts type en log UFC/cm² à 1, 5, 8, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 jours d'affinage réalisé sur 10 expérimentations étalées sur 31 mois. A 1, 8, 18, et 28 jours moyennes et écarts types sur 10 expérimentations ; à 14 jours sur 5 expérimentations, à 21 jours sur 4 expérimentations, à 11 et 25 jours sur 3 expérimentations et à 5 jours sur 2 expérimentations. Surface des fromages inoculés avec Contrôle = ferment de surface commercial (*Penicillium commune*), TR15 = consortium complexe issu de croûte de St Nectaire fermier de la première campagne de collecte.

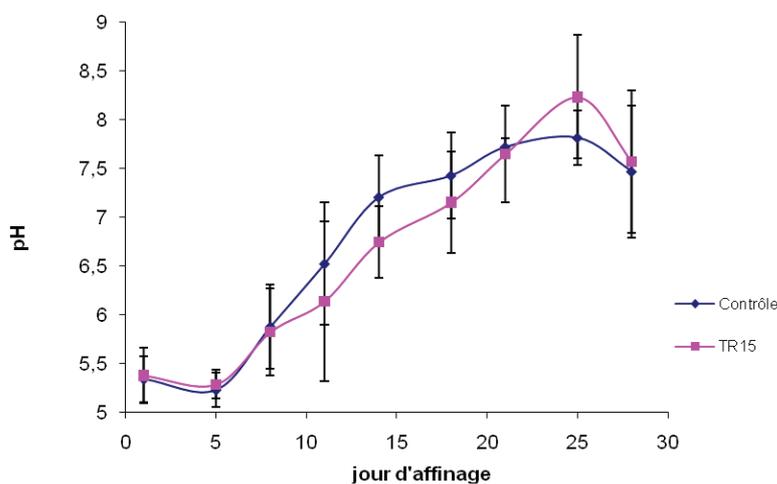


Figure 16 : Evolution du pH à la surface des fromages inoculés avec le consortium complexe TR15 ou *Penicillium commune*

Moyennes et écarts types de 10 expérimentations à 1, 5, 8, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 jours d'affinage. Réalisé sur 10 expérimentations étalées sur 31 mois. A 1, 8, 18, et 28 jours moyennes et écarts types sur 10 expérimentations ; à 14 jours sur 5 expérimentations, à 21 jours sur 4 expérimentations, à 11 et 25 jours sur 3 expérimentations et à 5 jours sur 2 expérimentations. Surface des fromages inoculés avec Contrôle = ferment de surface commercial (*Penicillium commune*), TR15 = consortium complexe issu de croûte de St Nectaire fermier de la première campagne de collecte.

5. Synthèse sur la croissance de *L. monocytogenes* sur des croûtes de fromages ensemencées avec TR15 ou *Penicillium commune*

5.1. Croissance de *L. monocytogenes* et pH

La croissance de *L. monocytogenes* et l'évolution du pH sur les croûtes de fromages préalablement ensemencées avec le consortium TR15 ou uniquement avec *Penicillium commune* (contrôle) ont été comparées par analyse de variance en prenant en compte les données de 10 expérimentations de cette thèse sur une période de 31 mois (cf. figure 15). A 8, 18 et 28 jours d'affinage les niveaux de *L. monocytogenes* à un temps donnée sont significativement plus faibles sur les croûtes des fromages ensemencées avec le consortium TR15 ($p=0,05$ $n=10$).

La conservation à -20°C ne semble pas affecter les propriétés anti-listeria du consortium TR15. Les niveaux maxima de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages avec le consortium TR15 varient d'une expérimentation à l'autre N_{max} minimum = 2,23 log UFC/cm² et N_{max} maximum = 4,2 log UFC/cm². Il en est de même du taux de croissance : $\mu_{\text{min}} = 0,08$ et $\mu_{\text{max}} = 0,25$. Mais les variations ne sont pas assez associées à la durée de conservation du consortium TR15 à -20°C (cf. figure 17) puisque le niveau N_{max} de *L. monocytogenes* après 31 mois de stockage à -20°C est similaire à celui obtenu après seulement 15 jours de conservation à -20°C . Ceci confirme les premiers résultats sur l'absence de perte des capacités inhibitrices après 3 mois de conservation à -20°C (cf. paragraphe 1.1).

Des variations de plus grande amplitude de la croissance de *L. monocytogenes* sont observées sur les croûtes avec uniquement *Penicillium commune* avec N_{max} minimum = 3,42 log UFC/cm² et N_{max} maximum = 7,66 log UFC/cm², $\mu_{\text{min}} = 0,13$ et $\mu_{\text{max}} = 0,37$ (figures 15 et 17). Elles pourraient être dues à une variabilité de la composition de la matière première ou de l'état physiologique de *L. monocytogenes*. Cependant, les niveaux de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages contrôle et ensemencées avec le consortium ne sont pas corrélés. Elles pourraient aussi être attribuées à la variabilité de l'état physiologique des souches du consortium ou du *Penicillium*. La présence ponctuelle de contaminants (en particulier les bactéries à Gram négatif) pourrait aussi expliquer cette variation. La présence de consortium complexe semble limiter cette variabilité d'une expérimentation à l'autre.

Quel que soit le stade d'affinage, le pH à un temps n'est pas significativement différent sur les croûtes de fromages avec le consortium TR15 ou *Penicillium*. Il augmente de 5,37 +/- 0,29 à 1 jour à 7,57 +/- 0,73 à 28 jours avec le consortium TR15 et de 5,34 +/- 0,23 à 1 jour à 7,47 +/- 0,68 à 28 jours avec les fromages contrôle.

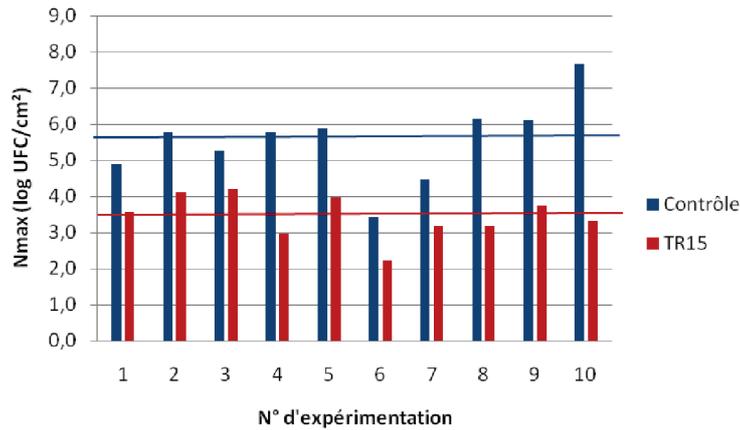
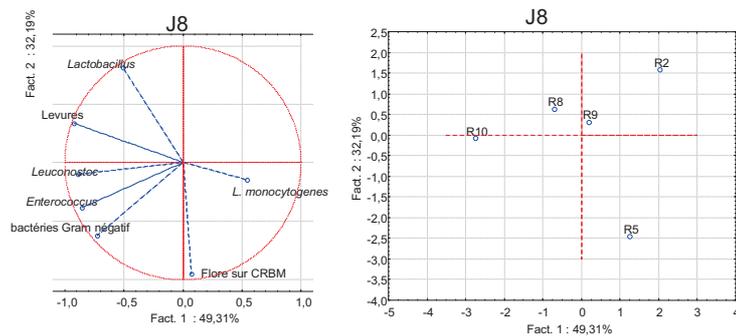


Figure 17 : Niveau maximum de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromages inoculées avec le consortium complexe TR15 ou *Penicillium commune* en fonction des expérimentations

Nmax = niveau maximum de *L. monocytogenes* à 28 jours d'affinage exprimé en log UFC/cm². Expérimentations 1 à 10 réalisées sur 31 mois, consortium TR15 conservé à -20°C pendant 1 = 15 jours, 2 = 3 mois, 3 = 4 mois, 4 = 9 mois, 5 = 14 mois, 6 = 16 mois, 7 = 21 mois, 8 = 24 mois, 9 = 26 mois, 10 = 31 mois. Surface des fromages inoculés avec Contrôle = ferment de surface commercial (*Penicillium commune*), TR15 = consortium complexe issu de croûte de St Neactaire fermier de la première campagne de collecte.

— moyenne Nmax TR15
— moyenne Nmax Contrôle

A/



B/

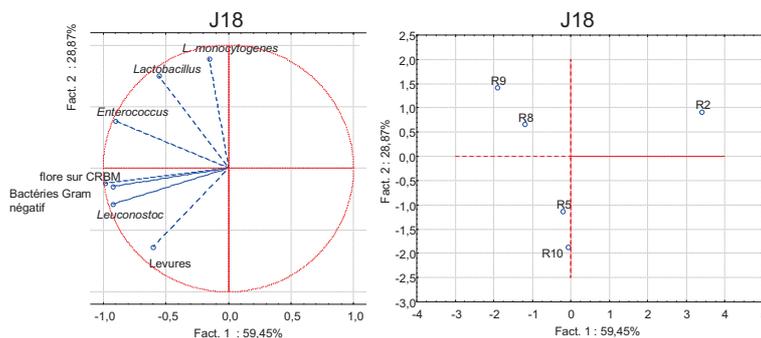


Figure 18 : Analyse en Composante principale des flores sur les croûtes des fromages TR15 au cours de l'affinage

Variables = niveaux des flores *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, flore totale sur CRBM, bactéries à Gram négatif, levures et *L. monocytogenes* à A/ 8 jours d'affinage, B/ 18 jours d'affinage sur 5 expérimentations R2, R5, R8, R9, R10.

A chaque temps, le pH n'est pas corrélé avec le niveau de *L. monocytogenes* (à 8 jours $r = 0,16$, à 18 jours $r = 0,38$, à 28 jours $r = 0,29$, $n=20$).

5.2. Variabilité des propriétés anti-listeria et dynamique des flores

L'Analyse en Composante Principale des différents niveaux des groupes microbiens à 8 jours et 18 jours discrimine les différentes expérimentations comme présenté dans la figure 18.

Les variations dans les équilibres microbiens d'une expérimentation sont difficiles à corrélérer à celles des niveaux de *L. monocytogenes*.

A 8 ou 18 jours, les consortiums des croûtes inoculées TR15 de l'expérimentation R2 se distinguent par leurs plus faibles niveaux de toutes les flores. Les consortiums des croûtes des expérimentations T8 et T9 se caractérisent par les plus hauts niveaux de *Lactobacillus* à 8 et 18 jours et celui de l'expérimentation T10 par le niveau de *Leuconostoc* le plus fort. A 8 jours, le consortium de croûte de l'expérimentation T5 a le niveau de flores sur le milieu CBM le plus élevé. A 18 jours, les consortiums des croûtes des expérimentations T5 et T10 ont les forts niveaux en levures.

L'analyse des profils SSCP des croûtes de fromage ou des milieux CRBM montre une variation de la dynamique et des équilibres microbiens d'une expérimentation à l'autre. Cependant, quelle que soit l'expérimentation, la communauté microbienne des croûtes des fromages inoculées avec TR15 est dominée par les espèces de *Ln. mesenteroides*, *Marini. psychrotolerans*, *Carnobacterium*, *Arthrobacter*, et/ou *S. pulvereri/ Br. thermosphacta*. Mais en début ou fin d'affinage, quelles que soient les expérimentations, *A. bergerei* et *S. pulvereri/Br. thermosphacta* sont détectés mais leur proportion relative varie d'une expérimentation à l'autre.

En conclusion, des variations dans la dynamique des profils microbiens du consortium TR15 d'une expérimentation à l'autre n'affectent que faiblement ses propriétés inhibitrices puisque le niveau N_{max} de *L. monocytogenes* est assez similaire (3,5 à 4 log UFC/cm²). Le moins inhibiteur lors de l'expérimentation T5 a le niveau de levures le plus fort et la plus faible proportion de *Ln. mesenteroides* en fin d'affinage.

Ces variations peuvent résulter de la conservation à -20°C, de modifications dans la composition de la matière première ou des conditions d'affinage même si celles-ci étaient contrôlées.

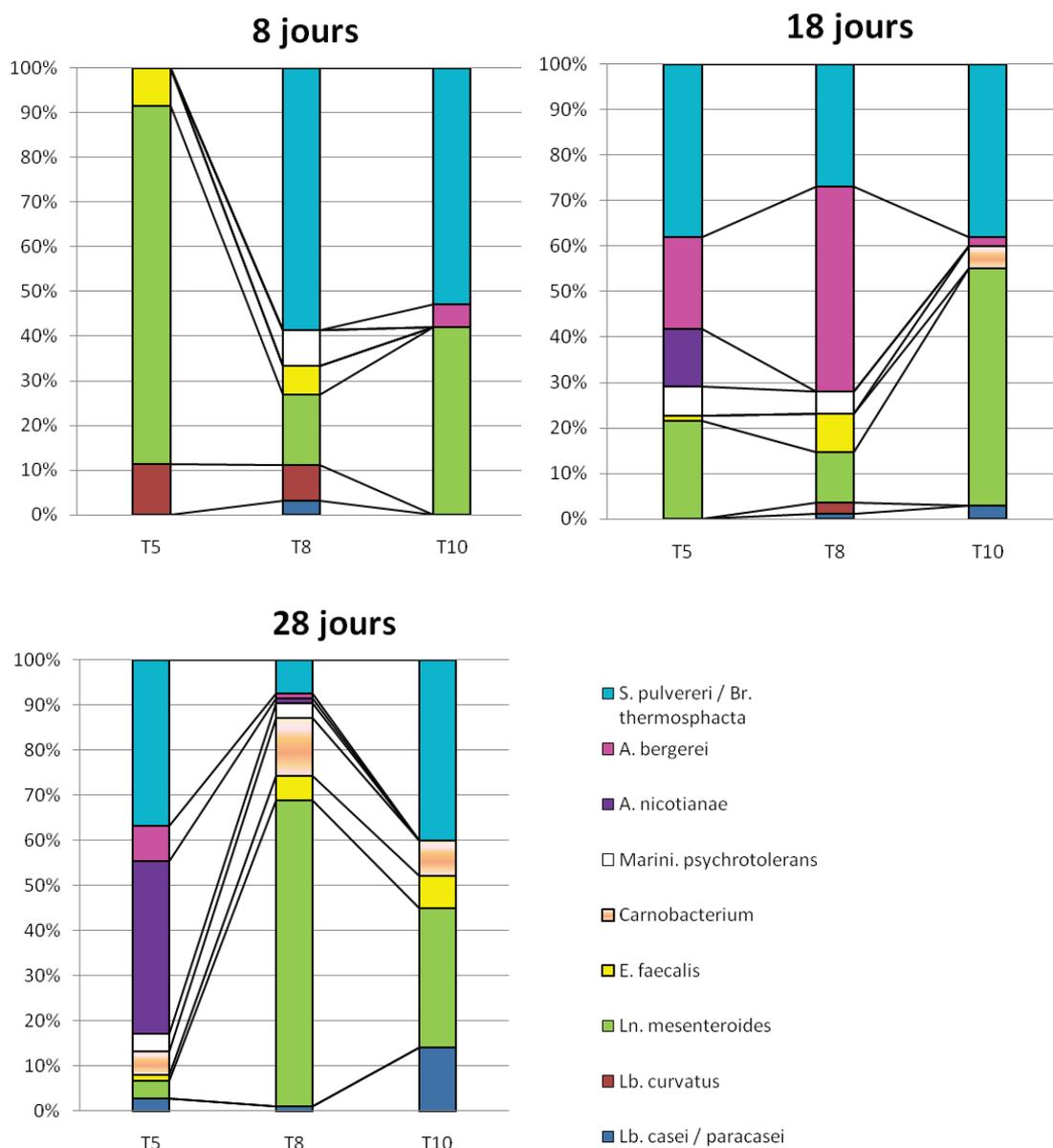


Figure 19 : Proportion des pics sur les profils SSCP des croûtes de fromages inoculées avec le consortium TR15 pour 3 expérimentations

Proportion P_i de chaque pic du profil obtenu à partir de l'analyse SSCP de la région V2 (brin Hex) des ADN totaux des croûtes de fromages à 8, 18 et 28 jours avec $P_i = a_i \cdot 100 / \sum a_i$ où a_i = aire du pic et $\sum a_i$ = somme des aires des pics du profil. Seules les espèces détectées et dominantes aux différents temps d'affinage sont présentées.

Croûtes des fromages inoculées avec le consortium complexe TR15 conservé à -20°C : T5 = 14 mois à -20°C, T8 = 24 mois à -20°C, T10 = 31 mois à -20°C.

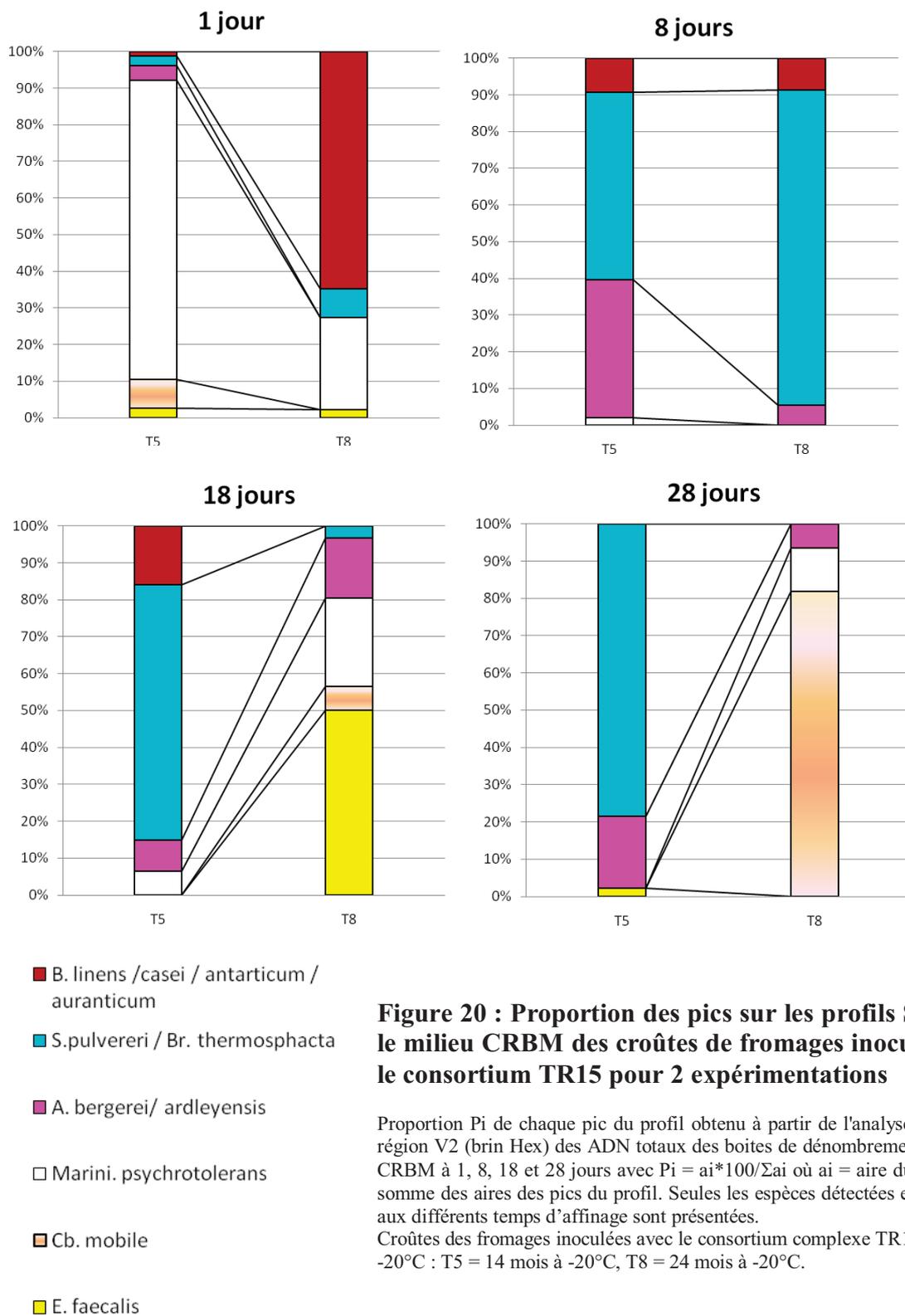


Figure 20 : Proportion des pics sur les profils SSCP sur le milieu CRBM des croûtes de fromages inoculées avec le consortium TR15 pour 2 expérimentations

Proportion P_i de chaque pic du profil obtenu à partir de l'analyse SSCP de la région V2 (brin Hex) des ADN totaux des boîtes de dénombrements du milieu CRBM à 1, 8, 18 et 28 jours avec $P_i = a_i * 100 / \sum a_i$ où a_i = aire du pic et $\sum a_i$ = somme des aires des pics du profil. Seules les espèces détectées et dominantes aux différents temps d'affinage sont présentées.

Croûtes des fromages inoculées avec le consortium complexe TR15 conservé à -20°C : T5 = 14 mois à -20°C , T8 = 24 mois à -20°C .

	j1		j8		j18		j28	
	moy	sd	moy	sd	moy	sd	moy	sd
galactose (mg/g FRO sec)	15,53	7,09	4,24	4,46	0,58	0,65	0,10	0,08
acide lactique (mg/g FRO sec)	18,94	3,96	19,45	5,71	12,87	7,57	5,71	4,18
acide acétique (mg/g FRO sec)	2,41	3,10	1,69	1,47	3,91	4,02	10,16	6,90
acide formique (mg/g FRO sec)	0,00	0,00	1,07	1,51	3,62	5,12	1,88	1,31

Tableau 38 : Concentrations moyennes en sucre et acides organiques sur les croûtes des fromages inoculées avec le consortium TR15

Dosages réalisés par méthode HPLC à 1, 8, 18 et 28 jours d'affinage. Résultats exprimés en mg/g de croûte de fromage sec (mg/g Fro sec). Moyennes et écarts types sur 3 expérimentations.

5.3. Variabilité de production des acides organiques

Quelles que soient les expérimentations, les quantités d'acide lactique diminuent et celles d'acide acétique augmentent au cours de l'affinage. En effet, les concentrations en acide lactique diminuent après 8 jours d'affinage tandis que celles de l'acide acétique augmentent. Les concentrations en galactose diminuent rapidement dès le premier jour d'affinage. L'acide formique est très faiblement produit en fin d'affinage. La concentration d'acide lactique pourrait être à l'origine de la non croissance de *L. monocytogenes* entre 1 et 8 jours d'affinage.

Conclusions et Perspectives

Le premier objectif de cette thèse était de repérer des communautés microbiennes complexes de fromages (fromages AOC St Nectaire) aux propriétés anti-listeria. Il a été atteint puisque parmi 34 consortiums de croûtes de fromages AOC St Nectaire au lait cru (18 et 28 jours d'affinage), 10 consortiums sont capables d'inhiber la croissance de *L. monocytogenes* à la surface d'un fromage au lait pasteurisé par comparaison avec un ensemencement de surface uniquement avec *Penicillium commune*. Les niveaux d'inhibition sont variables d'un consortium à l'autre. Le consortium le plus inhibiteur, TR15 sélectionné pour l'étude conserve ses propriétés inhibitrices pendant 31 mois de stockage à -20°C ou par propagation à la surface des fromages. Une application industrielle de ce consortium pourrait être développée par son utilisation lors des soins en cave. Les consortiums de croûtes de fromages fabriqués par un même producteur et affinés par un même affineur n'ont pas toujours les mêmes niveaux d'activité anti-listeria.

Le deuxième objectif était d'identifier les populations microbiennes d'un consortium inhibiteur et de suivre sa dynamique au cours de l'affinage. L'étude a effectivement révélé la grande diversité de la communauté microbienne du consortium TR15, suspension de croûte de fromage à 18 jours d'affinage. Celle-ci est composée d'au moins 30 espèces bactériennes, 4 espèces de levures et 3 moisissures. Parmi les 7 espèces de bactéries lactiques identifiées, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Ln. mesenteroides* et *E. faecalis* sont plus fréquemment rencontrées dans la pâte des fromages St Nectaire (Saubusse *et al*, 2007 ; Delbès *et al*, 2007). En revanche, les bactéries lactiques *Marini. psychrotolerans*, *Cb. mobile*, *Cb. maltaromaticum* et *Br. thermosphacta* (*Listeriaceae*) ont été plus rarement détectés à la surface des fromages. Si *Marini. psychrotolerans* peut représenter jusqu'à 40% des isolats de fromages à pâtes molles et croûte lavée (Maoz *et al*, 2003 ; Feurer *et al*, 2004), elle n'est qu'occasionnellement isolée dans divers autres fromages dont le St Nectaire (Delbès *et al*, 2007 ; Mounier *et al*, 2005 ; Ishikawa *et al*, 2007 ; Roth *et al*, 2010). De même, les espèces de *Carnobacterium* ont été décrites en surface de fromages Gorgonzola (Cocolin *et al*, 2009) et des fromages à croûte lavée (Feurer *et al*, 2004 ; Ishikawa *et al*, 2007). *Br. thermosphacta* n'a été que récemment isolé en surface des fromages Gorgonzola, Scimudin et Taleggio (Fontana *et al*, 2010). Les genres *Carnobacterium* et *Brochothrix* sont le plus souvent détectés dans les produits carnés ou les produits de la mer et peuvent être responsables de leur dégradation (cf. revue de Leisner *et al*, 2007 ; cf. revue de Borch *et al*, 1996).

Parmi les 12 espèces de bactéries à Gram positif et catalase positive identifiées dans le consortium complexe TR15, *A. bergerei* / *ardleyensis*, *A. nicotianae* / *arilaitensis*, *Brachybacterium* sp., *Brevibacterium* sp. et *S. xylosus* ont souvent été décrits en proportions variables sur les croûtes de fromages. Elles ont notamment été identifiées en surface des fromages St Nectaire (Théveny et Montel, 2007 ; Chatelard *et al*, 2009). D'autre part, *Arthrobacter* a été identifié parmi des isolats de fromages Chaumes (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001) et de surface de nombreux fromages (Maoz *et al*, 2003, Irlinger *et al*, 2005, El-Baradei *et al*, 2007, Ogier *et al*, 2004). *Brevibacterium* constitue jusqu'à 40% de la flore de surface des fromages à croûte lavée (Valdès-Stauber *et al*, 1997 ; Mayr *et al*, 2004). *S. pulvereri* préalablement identifié *S. vitulus/vitulinus* appartenant au groupe de *S. sciuri* (Svec *et al*, 2004), et *Leucobacter* sp. sont plus rarement décrits sur les croûtes des fromages. Ils sont présents sur les croûtes des fromages St Nectaire (Chatelard *et al*, 2009), livarot (Mounier *et al*, 2009), divers fromages à croûte lavée (Mayr *et al*, 2004, Maoz *et al*, 2003) et fromages à pâte molle égyptiens (El-Baradei *et al*, 2007). La population de bactéries à Gram négatif du consortium TR15 est composée de 10 espèces de bactéries à Gram négatif : *Prot. vulgaris*, *Ser. proteomaculans* / *liquefaciens*, *P. fluorescens* / *syringae*, *Ser. grimesii*, *Enterobacter amnigenus*, *Psychrobacter aquimaris*, *Psychrobacter celer*, *Psychrobacter pacificensis*, *Pseudoalteromonas* sp. et *Halomonas* sp. Ces espèces sont présentes en surface des fromages St Nectaire (Chatelard *et al*, 2009 ; Delbès *et al*, 2007), des fromages à croûte lavée (Mayr *et al*, 2004 ; Rea *et al*, 2007) ou encore sur les fromages Langres, Epoisses... (Ogier *et al*, 2004).

Les levures de la croûte du fromage St Nectaire TR15 appartiennent aux espèces *Debaryomyces hansenii*, *Candida sake* et *Yarrowia lipolytica* confirmant les résultats de Chatelard *et al* (2009) sur les croûtes de St Nectaire. Cependant, cette étude a mis en évidence une plus grande diversité avec les espèces *Torulaspora delbrueckii*, *C. alesphila*, *C. zelanoides*, *C. rugosa* et *Pichia membranaefaciens*. *D. hansenii* est souvent l'espèce dominante en surface de nombreux fromages à croûte lavée ou fleuries (Ogier *et al*, 2004, Mounier *et al*, 2005, Saubusse *et al*, 2007 ; Rea *et al*, 2007).

Le clonage et le séquençage direct de l'ADNr 16S n'ont pas renseigné sur la présence éventuelle de bactéries non cultivables. Seules les bactéries à Gram négatif ont été identifiées illustrant les limites d'une approche moléculaire directe et confirment les biais inhérents à l'extraction ou l'amplification des ADN.

Le suivi quantitatif de ces différentes espèces sur la croûte des fromages en cours d'affinage est difficile. Ces difficultés sont inhérentes à l'absence de milieux suffisamment sélectifs pour

quantifier par culture microbienne les 18 genres bactériens du consortium TR15. Seuls des milieux assez sélectifs quantifient les genres *Lactobacillus* (milieu FH), *Leuconostoc* (essentiellement les espèces productrices de dextrans sur milieu MSE) et dans une moindre mesure les *Enterococcus* (sur le milieu SB) même si notre étude montre la présence d'autres flores sur ce milieu. Les genres appartenant au groupe des bactéries à Gram positif et catalase positive sont difficilement quantifiables par méthode culture dépendante. Le milieu CRBM (Denis *et al*, 2001) souvent préconisé pour détecter les genres microbiens de ce groupe manque de sélectivité. Seul, *S. pulvereri* grâce à des colonies caractéristiques (grosse colonie blanche et plate) sur ce milieu peut être spécifiquement compté. Malgré la présence de 2% NaCl, d'inhibiteurs de bactéries à Gram négatif et des levures et moisissures, les bactéries lactiques se développent. L'analyse des colonies se multipliant sur le milieu CRBM par la technique SSCP a montré que *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Marinilactibacillus* et *Brochothrix* se multiplient sur ce milieu. Une quantification de ces espèces sur ce milieu ou sur un milieu non sélectif tel que le BHI est possible en se basant sur le pourcentage de chaque espèce sur un profil SSCP. Il semblerait cependant plus fiable d'identifier l'ensemble des colonies d'un milieu par séquençage de l'ADNr 16S. Ceci est de plus en plus envisageable car le séquençage direct sur colonies est rapide et le coût d'analyse des séquences est de plus en plus faible.

La technique d'analyse SSCP des ADNr 16S directement sur les croûtes et/ou les milieux de culture est intéressante pour le suivi de la dynamique des populations à Gram positif dominantes sur les croûtes des fromages. L'analyse de la région V3 des ADNr 16S est plus adaptée pour l'analyse des populations à Gram négatif. La technique nécessite de prendre un certain nombre de précautions pour identifier les espèces co-éluants dans un même pic, qui sont faciles à prendre lorsque, comme dans notre étude, la composition des consortiums est connue. L'interprétation des profils bactériens de l'analyse SSCP doit aussi s'appuyer sur les données de microbiologie classique pour lever le doute lorsque plusieurs espèces coéluent dans un même pic. La quantification de *S. pulvereri* sur milieux aide à interpréter l'ambiguïté liée à la coélution de *S. pulvereri* et *Br. thermosphacta*. Par contre, la technique de SSCP par analyse des régions V3 et V2 des ADNr 16S n'est pas performante pour suivre la dynamique des populations de *Lactobacillus*. Celles-ci sont souvent absentes des profils SSCP alors que leurs niveaux par dénombrement (de 4 à 7 log UFC/cm²) peuvent être aussi élevés que ceux des autres espèces. La détection par SSCP des cellules vivantes et mortes est également informative par comparaison avec des données culture dépendante car elle peut renseigner sur

la cultivabilité des microorganismes ou leur état physiologique. Ainsi, dans une reconstitution les leuconostocs étaient détectés sur les profils SSCP et non quantifiés sur milieu de culture. Malgré leurs limites, la combinaison des méthodes cultures dépendantes et indépendantes informe sur la dynamique des populations microbiennes au cours de l'affinage et en fonction de la composition initiale des consortiums. Ainsi, toutes les espèces, excepté *Leucobacter*, du consortium TR15 ont pu être détectées sur les fromages inoculés avec ce consortium au cours de l'affinage. Le consortium TR15 est caractérisé en début d'affinage par la dominance des espèces de bactéries lactiques dont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* et *Brochothrix*. En fin d'affinage, les proportions des espèces dominantes *A. bergerei*, *S. pulvereri*, *Br. thermosphacta*, *Carnobacterium* varient plus ou moins en fonction de l'expérimentation. En effet, *A. bergerei* était dominant lors de la 2^{ème} série de reconstitution tandis que *Br. thermosphacta*, *Carnobacterium* et *Marinilactibacillus* l'étaient lors de la dernière reconstitution. Certaines espèces notamment *S. xylosus* et *Brachybacterium* n'ont été retrouvées que ponctuellement par les différentes méthodes indiquant que ces espèces sont probablement sous-dominantes dans le consortium TR15. La dynamique des espèces de la population de bactéries à Gram négatif, en nombre élevé en fin d'affinage n'a pas été étudiée. Les espèces de levures *Debaryomyces hansenii*, *Candida sake* et *Yarrowia lipolytica* ont été détectées tout au long de l'affinage. Elles avaient une croissance maximale au début de l'affinage. Il est difficile de quantifier chaque espèce en raison de la présence des moisissures envahissantes sur le milieu de culture. Une interaction possible entre *S. pulvereri* et *Ln. mesenteroides* a été mise en évidence lors de la reconstitution 3. En effet, l'absence de *Ln. mesenteroides* dans le consortium reconstitué A(-)BCD favoriserait la croissance de *S. pulvereri* surtout en fin d'affinage.

Le troisième objectif sur la reconstitution de consortiums simplifiés aussi inhibiteurs que le complexe, sur l'identification des populations impliquées dans l'inhibition et la nature de l'inhibition a été plus difficile à atteindre. Tout d'abord, la reconstitution de consortium inhibiteur n'a pas pu s'appuyer sur le criblage des propriétés anti-listeria des souches par méthode de diffusion en milieu gélosé (Tagg et McGiven, 1971). En effet, aucune souche n'était inhibitrice dans les conditions du test. La première stratégie de simplification par omission successive de groupes microbiens à partir d'un consortium complexe constitué d'une souche de chaque espèce dominante en cours d'affinage n'a pas été fructueuse. Aucun consortium n'avait de propriétés équivalentes au TR15 et la dynamique des populations différait de celle du TR15. La pré-culture des souches pourrait expliquer le défaut d'implantation de certaines espèces. Ainsi nous avons montré

qu'une souche de *Ln. mesenteroides* s'implantait mieux si elle était pré-cultivée dans un bouillon MRS au lieu de BHI. L'échec pourrait aussi être imputable à un nombre insuffisant de souches ou d'espèces dans le consortium. En effet, l'augmentation du nombre de souches de chaque espèce dans le consortium (56 souches au lieu de 19) accroît les propriétés inhibitrices.

La stratégie de reconstitution par collecte de l'ensemble des colonies se multipliant sur divers milieux est prometteuse. Elle évite la fastidieuse préculture des souches et augmente le degré de diversité (souches – espèces) du consortium. Elle a permis de définir un consortium à la capacité inhibitrice similaire à celle du TR15 surtout en début d'affinage. La comparaison de la dynamique des flores microbiennes de ce consortium composé de flores se multipliant sur le milieu BHI, avec celle du TR15 dans différentes expérimentations ainsi que celle de différents consortiums non inhibiteurs permet d'émettre des hypothèses sur les flores microbiennes impliquées dans l'inhibition. Nous pouvons ainsi privilégier l'hypothèse que l'inhibition serait associée à une diversité de bactéries lactiques et en particulier à la présence de *Marini. psychrotolerans*, *Cb. mobile*, *Cb. maltaromaticum*, *Ln. mesenteroides* et *Br. thermosphacta*. L'hypothèse du rôle de *Marini. psychrotolerans* dans l'inhibition est confortée par les travaux de Roth *et al*, (2010) mentionnant l'implication d'espèces d'origine marine dans l'inhibition de *L. monocytogenes* à la surface des fromages à croûte lavée. *Ln. mesenteroides* pourrait également être impliqué dans l'inhibition. Les capacités inhibitrices de ces espèces de bactéries lactiques peuvent être contrecarrées par un niveau élevé de levures en fin d'affinage. Les espèces *S. pulvereri*, *Arthrobacter* et *Leucobacter sp.* qui sont les populations dominantes tout au long de l'affinage sur les fromagesensemencés avec des consortiums avec un développement plus élevé de *L. monocytogenes* ne seraient pas impliquées dans l'inhibition. Ces résultats sont discordants par rapport à ceux de la littérature qui attribueraient l'inhibition de *L. monocytogenes* par des consortiums complexes à la dominance de diverses bactéries à Gram positif et catalase positive (*M. gubbeennese*, *A. nicotianae*, *B. linens*, *Cor. casei*, *Cor. variabile* (Eppert *et al*, 1997 ; Maoz *et al*, 2003 ; Mayr *et al*, 2004 ; Bockelmann *et al*, 2005). Cependant, la communauté microbienne du consortium TR15 ne contenait pas d'espèces appartenant au genre *Corynebacterium*.

Le système inhibiteur du consortium complexe TR15 est robuste car des variations quantitatives des flores n'affectent pas l'inhibition. L'hypothèse que l'inhibition pourrait être associée à des groupes fonctionnels producteurs ou consommateurs d'acides organiques peut être formulée d'après nos résultats. En effet, l'inhibition de *L. monocytogenes* sur les croûtes des fromagesensemencés avec le consortium TR15 peut être associée aux concentrations

d'acide lactique (en moyenne 18,9 mg/g à 1 jour) en début d'affinage et d'acide acétique (en moyenne 10 mg/g à 28 jours) en fin d'affinage. La plus forte capacité des *Lb. casei*, *Ln. mesenteroides*, *Cb. maltaromaticum*, *E. faecalis* et *Br. thermosphacta* à produire ces acides en milieu fromager de laboratoire confortent leur rôle potentiel dans l'inhibition. En effet, *Lb. casei*, *Ln. mesenteroides*, *E. faecalis*, *Cb. maltaromaticum* et *Br. thermosphacta* sont les plus forts producteurs d'acide lactique et d'acide acétique. De telles productions d'acides ont été décrites dans la littérature. Le catabolisme du lactose et du glucose par les bactéries lactiques *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp. ou *Ln. mesenteroides* a été revu par Hemme et Foucaud-Scheunemann (2004). Bertelsen *et al* (2001) ont précisé que ces genres pouvaient produire de l'acide acétique par catabolisme du lactose ou du galactose par les voies de Leloir et T-tagatose. Sarantinopoulos *et al*, (2001) relatent le métabolisme de l'acide lactique et l'acide citrique en acides acétique, formique et éthanol dans un milieu lait par *E. faecalis*. *Br. thermosphacta* produit principalement de l'acide acétique dans notre étude ce qui corrobore les résultats de Dainty et Hibbard (1980) en conditions aérobie. Les capacités de *Marini. psychrotolerans* à produire des acides n'ont pas pu être déterminées dans cette étude. Mais d'après les travaux de Ishikawa *et al*, (2003) *Marini. psychrotolerans* est aéro-anaérobie et fermente le glucose en produisant principalement de l'acide lactique L, de l'acide formique, de l'acide acétique et de l'éthanol.

Outre la consommation d'acide lactique possible par *E. faecalis*, celle-ci peut aussi être attribuée à *D. hansenii* (Brennan *et al*, 2002 ; Leclercq-Perlat *et al*, 1999) et *Y. lipolytica* (Mansour *et al*, 2008). Afin d'assurer l'inhibition de *L. monocytogenes*, il serait donc souhaitable que les levures restent sous-dominantes. Cependant un équilibre reste à trouver car les levures ont un rôle prépondérant dans le développement des qualités sensorielles des fromages. En effet, elles ont des potentialités de production de molécules aromatiques importantes et peuvent favoriser l'implantation des flores d'affinage. Le rôle des acides organiques dans l'inhibition de *L. monocytogenes* a souvent été décrit. En effet, Millet *et al* (2006) ont montré que des teneurs en acide lactique-L supérieures à 14 mg/g inhiberaient *L. monocytogenes* dans la pâte des fromages type St Nectaire. Ces résultats ont été confirmés par Saubusse (2007). Dans un fromage blanc, l'acide acétique est efficace pour contrôler la croissance de *L. monocytogenes* (Glass *et al*, 1995) et l'acide lactique à 1,4% l'inhibe en surface des fromages Stracchino (Stecchini *et al*, 1996). *L. monocytogenes* peut être inhibée par le formate et l'acétate (Ostling et Lindgren, 1993 ; Saubusse, 2007).

Le rôle des acides organiques dans l'inhibition reste à approfondir pour préciser le rôle des formes dissociées et non dissociées. Les valeurs de pH des croûtes des fromages entre 1 et 8

jours variant entre 5,2 et 6 en moyenne, favoriseraient la dissociation de l'acide lactique qui serait moins inhibiteur.

Aucune des souches des consortiums ne produisaient de bactériocines selon la méthode de Tagg et McGiven (1971). Cependant, des souches appartenant aux espèces du consortium *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, et *Enterococcus* ont été décrites comme productrices de bactériocines dans la littérature (Daba *et al*, 1991 ; Wan *et al*, 1997 ; Jasniewshi *et al*, 2009, Giannou *et al*, 2009). L'implication de bactériocines dans l'inhibition de *L. monocytogenes* en fromage est difficile à démontrer. Leur rôle possible dans l'inhibition est soit argumenté sur leurs potentialités à en produire en milieu de laboratoire (Rodriguez *et al*, 1995, 2000) ou sur la recherche de gènes codant les bactériocines (Giannou *et al*, 2009). Jusqu'à présent, les bactériocines n'ont jamais été quantifiées dans les fromages et elles peuvent être dégradées par des protéases fréquentes dans les fromages. Quelques études suggèrent que des souches productrices de bactériocines telles que *B. linens* productrice d'une linocine (Eppert *et al*, 1997) ou *Lb. plantarum* productrice de pédiocine (Loessner *et al*, 2003) pourraient être impliquées dans l'inhibition de *L. monocytogenes* en fromages. Dans le cadre du programme européen TRUEFOOD, l'Université technique de Munich a cependant montré par RT-PCR, la transcription d'un gène codant une bactériocine (Neuhaus *et al*, 2009). Les travaux de Gobbetti *et al* (2007) suggèrent que la régulation de la synthèse des bactériocines est un phénomène complexe et que ces molécules pourraient intervenir dans le quorum sensing.

L'effet Jameson attribuant l'inhibition à une forte densité cellulaire est difficile à formuler d'après nos résultats. En effet, plusieurs consortiums non inhibiteurs étaient dominés par quelques espèces à un niveau élevé par exemple, *S. pulvereri* dans ABCD, de la reconstitution 2, *S. pulvereri* et *E. faecalis* dans A(-)BCD de la reconstitution 3 ou encore *Leucobacter sp.* dans BR de la reconstitution 4.

Les résultats de cette thèse montrent que l'inhibition de *L. monocytogenes* par une approche de biopréservation doit intégrer les interactions microbiennes. Ils arguent pour un rôle des acides organiques dans l'inhibition. Pour étudier les interactions microbiennes, il sera tout d'abord nécessaire de définir un consortium pouvant servir de modèle d'étude. Celui-ci devra être constitué de souches capables de produire des acides organiques telles que *Ln. mesenteroides*, *Cb. mobile*, *Cb. maltaromaticum*, *Marini. psychrotolerans* et *Br. thermosphacta*. Le consortium devra également comprendre des souches capables de consommer les acides organiques. Ces souches de levures et bactéries pourront être

sélectionnées par criblage de leurs potentialités sur milieu fromager de laboratoire. Des consortiums de composition plus simple que ceux définis dans cette thèse et ne comportant que 4 à 5 souches au maximum pourront être ainsi étudiés. Il sera alors possible de définir un consortium simplifié répondant aux exigences de l'industrie laitière en termes de composition avec un nombre limité de souches et en termes d'innocuité selon le schéma Qualified Presumption of Safety (QPS) de l'EFSA. Leur innocuité devra être établie en vérifiant l'absence de production d'amines en surface des fromages, en particulier si les souches de *Carnobacterium* sont retenues dans le consortium (Masson *et al*, 1996) vu leur capacité à en produire. L'étude devra s'appuyer sur une double approche métabolique et génomique. L'approche de transcriptomique pourrait s'appuyer sur une analyse *in silico* des voies métaboliques et sur l'exploitation des données des génomes séquencés si ceux-ci sont disponibles pour les espèces qui nous intéressent.

Références Bibliographiques

- Abriouel, H., A. Martin-Platero, M. Maqueda, E. Valdivia, and M. Martinez-Bueno. (2008)** Biodiversity of the microbial community in a spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 127, n°3 : 200-208.
- Alvarado, C., B. E. Garcia-Almendírez, S. E. Martin, and C. Regalado. (2005)** Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan mexican-style cheese. *Current Microbiology*, 51, n° 2 : 110-115.
- Ampe, F., N. ben Omar, and J. P. Guyot. (1999)** Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: Application to Pozol, a mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology*, 87, n° 1: 131-40.
- Angelidis, A. S., and G. M. Smith. (2003)** Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress." *Applied and Environmental Microbiology* 69, n° 2: 1013-22.
- Aquilanti, L. , G. Silvestri, E. Zannini, A. Osimani, S. Santarelli, and F. Clementi. (2007)** Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *Journal of Applied Microbiology* 103, n° 4: 948-60.
- Arfi, K., H. Spinnler, R. Tache, and P. Bonnarme (2002).** Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: Requirement for a methanethiol donor for S-methyl Thioacetate Synthesis by *Kluyveromyces Lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, n° 4: 503-10.
- Aurora, R., A. Prakash, and S. Prakash. (2009)** Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and ready-to-eat indigenous milk products. *Food Control* 20, n° 9: 835-39.
- Bachmann, H. P., and U. Spahr. (1995)** The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *Journal of Dairy Science* 78, n° 3: 476-83.
- 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, n° 1: 1-20.
- Berche B, Brisabois A, Catteau M, Flandrois JP, L JC, Rocourt J, et al. (2000)** Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. Commission *Listeria* AFSSA 2000.
- 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.

- Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan, and T. M. Cogan. (2001)** Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259-74.
- Bertelsen, H., H. Andersen, and M. Tvede. (2001)** Fermentation of D-tagatose by human intestinal bacteria and dairy lactic acid bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease* 13, no. 2: 87-95.
- Berthier, F., and S. D. Ehrlich. (1999)** Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, no. 3: 997-1007.
- Berthier, F., E. Beuvier, A. Dasen, and R. Grappin. (2001)** Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal* 11, no. 4-7: 293-305.
- Beuvier, E., and S. Buchin. (2004)** Raw milk cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed., P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, 319-45. Vol. 1 - General aspects. 2004.
- Bjorck, L. (1978)** Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotropic bacteria in milk. *Journal of Dairy Research* 45, no. 1: 109-18.
- Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. (2003)** Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 7: 4116-22.
- Bockelmann, W., Krusch, U., Engel, G., Klijn, N., Smit, G., and Heller, K. J. (1997).** The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung*, 41, 208–212.
- Bockelmann, W., and T. Hoppe-Seyler. (2001)** The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* 11: 307-14.
- Bockelmann, W. (2002)** Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 12: 123-31.
- Bockelmann, W., K. P. Willems, H. Neve and K. H. Heller. (2005)** Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 15, 719-732
- Bockelmann, W., M. Koslowsky, P. Hamer and K. J. Heller. (2006)** Isolation of antilisterial Staphylococci from salt brines and cheese surface. *Kieler Michvirtsschaftliche Forschungsberichte*
- 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: 601-9.
- Bonaiti, C., M.-N. Leclercq-Perlat, E. Latrille, and G. Corrieu. (1999)** Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: relative humidity and temperature influences. *Journal of Dairy Science* 87, no. 11 (2004): 3976-88.

Borch, E., Kant-Muermans, M-L., and Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products: specific spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 33, no. 1: 103-120.

Bottarelli, A., S. Bonardi, and S. Bentley. (1999) Presence of *Listeria* spp. in short-ripened cheeses. *Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma - Lavoro effettuato con contributo MURST 98/40%*.

Bougle, D. L., and V. Stahl. (1994) Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of Camembert cheeses made from raw milk. *Journal of Food Protection* 57: 811-13.

Bouton, Y., P. Guyot, E. Beuvier, P. Tailliez, and R. Grappin. (2002) Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology* 76, no. 1-2 (2002): 27-38.

Boutrou, R., and M. Guéguen. (2005) Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology* 102, no. 1 (2005): 1-20.

Boziaris, I. S., P. N. Skandamis, M. Anastasiadi, and G.-J. E. Nychas. (2007) Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology* 102, no. 3: 796-805.

Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, P. J. Simpson, P. F. Fox, and T. M. Cogan. (2001a) *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: 843-52.

Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, M. Vancanneyt, T. M. Cogan, and P. F. Fox. (2001b) *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, no. 6: 1969-76.

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.

Brito, J. R. F., E. M. P. Santos, E. F. Arcuri, C. C. Lange, M. A. V. P. Brito, G. N. Souza, M. M. P. O. Cerqueira, J. M. S. Beltran, J. E. Call, Y. Liu, A. C. S. Porto-Fett, and J. B. Luchansky. (2008) Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74, no. 15: 4954-61.

Brouillaud-Delattre, A., M. Maire, C. Collette, C. Mattei, and C. Lahellec. (1997) Predictive microbiology of dairy products: Influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International* 80, no. 4: 913-19.

Buazzi, M. M., M. E. Johnson, and E. H. Marth. (1992a) 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. (1992b) Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss cheese. *Journal of Dairy Science* 75 , no. 2: 380-386.

Buazzi, M. M., M. E. Johnson, and E. H. Marth. (1992c) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Mozzarella cheese. *Journal of Food Protection* 55 (1992): 80-83.

Bunning, V. K., R. G. Crawford, J. T. Tierney, and J. T. Peeler. (1992) Thermotolerance of heat-shocked *Listeria monocytogenes* in milk exposed to high-temperature, short-time pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology* 58, no. 6: 2096-98.

Buyong, N., J. Kok, and J. B. Luchansky. (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, no. 12: 4842-45.

Cailliez-Grimal, C., R. Miguindou-Mabiala, M. Leseine, A. M. Revol-Junelles, and J. B. Millière. (2005) Quantitative Polymerase Chain Reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from french soft cheeses. *FEMS Microbiology Letters* 250, no. 1: 263-69.

Cailliez-Grimal, C., H. C. Edima, A.-M. Revol-Junelles, and J.-B. Millière. (2007) Short Communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: The only *Carnobacterium* species in french ripened soft cheeses as revealed by Polymerase Chain Reaction detection. *Journal of Dairy Science* 90, no. 3: 1133-38

Calderon-Miranda, M. L., G. V. Barbosa-Cenovas, and B. G. Swanson. (1999) Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by Pulsed Electric Fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 51, no. 1: 19-30.

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: 231-44.

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: 172-80.

Callon, C., F. Duthoit, C. Delbès, M. Ferrand, Y. Le Frileux, R. De Crémoux, and M. C. Montel. (2007) Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* 30, no. 7: 547-60.

Cantoni, C., Comi, G. and Valenti M. (1988) Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheeses. *Industrie Alimentari*, 27, 266-268

Cantoni, C., Valenti M. and D'Aubert S. (1990) *Listeria* spp. In some foods and problems arising from its presence. *Industrie Alimentari*, 29, 22-23

Cardinale, M., L. Brusetti, P. Quatrini, S. Puglia A. M. Borin, A. Rizzi, E. Zanardini, C. Sorlini, C. Corselli, and D. Daffonchio. (2004) Comparison of different primer sets for use

in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 10: 6147-56.

Carminati, D., E. Neviani, G. Ottogalli, and G. Giraffa. (1999) Use of surface-smear bacteria for inhibition of *Listeria monocytogenes* on the rind of smear cheese. *Food Microbiology* 16, no. 1: 29-36.

Carnio, M. C., I. Eppert, and S. Scherer. (1999) Analysis of the bacterial surface ripening flora of german and french smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. *International Journal of Food Microbiology* 47, no. 1-2: 89-97.

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: 2378-84.

Casalta, E. and Montel, M.-C. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus: Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 126, no. 3: 271-273

Casalta, E., J.-M. Sorba, M. Aigle, and J.-C. Ogier. (2009) Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology* 133, no. 3: 243-51.

Cetinkaya, F., and G. E. Soyutemiz. (2004) A study on survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Kashar cheese. *Journal of Veterinary Animal Science* 28: 927-32.

Chatelard, C., Albouy, H., Théveny, L., Sicot, P., Hulin, S., and M. C., Montel. (2009) How the inoculation of a complex consortium and the ripening conditions affect the appearance of Saint-Nectaire cheeses? 4th IDF *Dairy Science and Technology* week – Rennes – France.

Cherrington, C. A., M. Hinton, and I. Chopra. (1990) Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 68, no. 1: 69-74.

Cibik, R., E. Lepage, and P. Tailliez. (2000) Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA Fragment Amplification." *Systematic and Applied Microbiology* 23, no. 2: 267-78.

Cocolin, L., D. Nucera, V. Alessandria, K. Rantsiou, P. Dolci, M. A. Grassi, S. Lomonaco, and T. Civera. (2009) Microbial ecology of Gorgonzola rinds and occurrence of different biotypes of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 133, no. 1-2: 200-205.

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: 409-21.

Colak, H., H. Hampikyan, E. B. Bingol, and B. Ulusoy. (2007) Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control* 18, no. 5: 576-79.

Condon S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters* 46, no. 3 (1987): 269-80.

Coppola, S., V. Fusco, R. Andolfi, M. Aponte, G. Blaiotta, D. Ercolini, and G. Moschetti. (2006) Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior Di Latte Di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of Dairy Research* 73, no. 03: 264-72.

Corroler, D., I. Mangin, N. Desmasures, and M. Gueguen. (1998) An ecological study of Lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese Registered Designation of Origin Area. *Applied and Environmental Microbiology* 64, no. 12: 4729-35.

Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobbetti. (2001) Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69, no. 1-2: 1-10.

Cossart, P., and A. Toledo-Arana. (2008) *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview: 10th anniversary of Microbes and Infection. *Microbes and Infection* 10, no. 9 (2008): 1041-50.

Cowan, D., Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron, and P. Wittwer. (2005) Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends in Biotechnology* 23, no. 6: 321-29.

Crandall, A. D., and T. J. Montville. (1998) Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* 64, no. 1: 231-37.

Cunningham, E., C. O'Byrne, and J. D. Oliver. (2009) Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: evidence for a viable but nonculturable state in response to low PH. *Food Control* 20, no. 12: 1141-44.

Daba, H, S Pandian, J F Gosselin, R E Simard, J Huang, and C Lacroix. (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, no. 12: 3450-3455.

Dainty, R. H. and C. M. Hibbard. (1980) Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *Journal of Applied Microbiology* 48, no. 3: 387-96.

Dale, G. (1972) Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire. *Revue Laitière Française* 199-203.

D'Amico, D. J., M. J. Druart, and C. W. Donnelly. (2008) 60-Day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized

milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. *Journal of Food Protection* 71, no. 8: 1563-71.

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: 343-46.

De Buyser, M. L., B. Lombard, S. M. Schulten, P. H. In't Veld, S. L. Scotter, P. Rollier, and C. Lahellec. (1999) Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *International Journal of Food Microbiology* 83, no. 2: 185-94.

Deetae, P., P. Bonnarme, H. Spinnler, and S. Helinck. (2007) Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened french cheeses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, no. 5: 1161-71.

Deetae, P., J. Mounier, P. Bonnarme, H. E. Spinnler, F. Irlinger, and S. Helinck. (2009a) Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology* 9999, no. 9999.

Deetae, P., H.-E. Spinnler, P. Bonnarme, and S. Helinck. (2009b) Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter sp.* during ripening in a cheese model medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, no. 1: 169-77.

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: 1882-91.

Delbès, C., J. J. Godon, and R. Moletta. (1998) rDNA Sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Anaerobe* 4: 267-75.

Denis C., M. Gueguen, E. Henry, and D. Levert. (2001) New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81: 365-79.

Depouilly A., Dufrene F., Beuvier E., and F. Berthier. (2001) Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait* 84: 155-167.

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.

Dolci, P., V. Alessandria, G. Zeppa, K. Rantsiou, and L. Cocolin. (2008a) Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, no. 2: 392-99.

Dolci, P., V. Alessandria, K. Rantsiou, L. Rolle, G. Zeppa, and L. Cocolin. (2008b) Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology* 122, no. 3: 302-11.

Dolci, P., A. Barmaz, S. Zenato, R. Pramotton, V. Alessandria, L. Cocolin, K. Rantsiou, and R. Ambrosoli. (2009) Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *Journal of Applied Microbiology* 106, no. 1: 278-87.

Doyle, M. P. , A. K. Glass, T. J. Beery, A. G. Garcia, D. J. Pollard, and D. R. Schultz. (1987) Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology* 53, no. 3: 1433-38.

Durmaz, H. (2009) Fate of *Listeria monocytogenes* in Carra cheese during manufacture and ripening. *Journal of Food Safety* 29, no. 2: 253-60.

Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology* 58, no. 1: 587-610.

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.

Duthoit, F., Tessier, L., Montel, M.-C. (2005) Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in 'Registered Designation of Origin' Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Applied Microbiology* 98, no. 5: 1198-1208.

Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 33, no. 1: 24-27.

Edima, H. C., C. Cailliez-Grimal, A.-M. Revol-Junelles, E. Rondags, and J.-B. Milliere. (2008) Short Communication: Impact of pH and temperature on the acidifying activity of *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of Dairy Science* 91, no. 10: 3806-13.

EFSA –European Food Safety Authority – Annual Activity Report

El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet, and J.-C. Ogier. (2007) Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73, no. 4: 1248-55.

El-Baradei, G., A. Delacroix-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.

El-Shenawy, M. A., Garcia, H. S. and E. H. Marth. (1990) Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or a semi-synthetic medium. *Food contamination and toxicology* 45, no. 10: 638-641.

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: 1429-148.

Eliskases-Lechner, F., and W. Ginzinger. (1995) The Bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait* 75: 271-584.

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, D Aoude-Werner, O Sorokine, A Van Dorsselaer, F Bringel, JC Hubert, and C Hasselmann. (1996) Production of Pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, no. 12: 4381-87.

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: 186-91.

Ennahar, S., K. Sonomoto, and A. Ishizaki. (1999) Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, no. 6: 705-16.

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: 449-57.

Ennahar, S., Y. Asou, T. Zendo, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. (2001) Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology* 70, no. 3: 291-301.

Eppert, I., N. Valdes-Stauber, H. Gotz, M. Busse, and S. Scherer. (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, no. 12: 4812-17.

Ercolini, D., P. J. Hill, and C. E. R. Dodd. (2003a) Bacterial community structure and location in Stilton Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 6: 3540-3548.

Ercolini, D., P. J. Hill, and C. E. R. Dodd. (2003b) Development of a Fluorescence in Situ Hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *Journal of Microbiological Methods* 52, no. 2: 267-71.

Ercolini, D., G. Mauriello, G. Blaiotta, G. Moschetti, and S. Coppola. (2004) PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* 96, no. 2: 263-70.

Ercolini, D. , V. Fusco, G. Blaiotta, F. Sarghini, and S. Coppola. (2005) Response of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* to the thermal stress occurring in model manufactures of Grana Padano cheese. *Journal of Dairy Science* 88, no. 11: 3818-25.

European Commission. (2001). Regulation (EC), No 466/2001 of 8 March 2001. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal, L 77, 16, March 2001, pp. 1–13.

Farber, J. M. and Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Review* 55, no. 3: 476-511.

Feurer, C., F. Irlinger, H. E. Spinnler, P. Glaser, and T. Vallaey. (2004) Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology* 97, no. 3: 546-56.

Fisher, M. M., and E. W. Triplett. (1999) Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 65, no. 10: 4630-4636.

Fleet, G. H. (1990) Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68, no. 3: 199-211.

Florez, A. B., and B. Mayo. (2006a) Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 110, no. 2: 165-71.

Florez, A. B., and B. Mayo. (2006b) PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal* 16: 1205-10.

Fonberg-Broczek¹, M., B. Windyga, J. Szczawiński, M. Szczawińska, D. Pietrzak, and G. Prestamo. (2005) High pressure processing for food safety. *Acta Biochimic Polonica* 52, no. 3: 721-24.

Fontana, C., Cappa, F., Rebecchi, A. and P.S.Cocconcelli. (2010) Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 138, no. 3, 205-211.

Foster, J. W. (1999) When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology* 2, no. 2: 170-174.

Foulque Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, no. 1: 1-24.

Francois, K., Valero, A., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., Garcia-Gimeno, R.M., Zurera, G. and Devlieghere, F. (2007) Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. *Food Microbiology* 24, no. 1: 32-43.

Furet, J.-P., P. Quenee, and P. Tailliez. (2004) Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using Real-Time Quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 97, no. 2: 197-207.

Gala, E., S. Landi, L. Solieri, M. Nocetti, A. Pulvirenti, and P. Giudici.(2008) Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano Ccheese. *International Journal of Food Microbiology* 125, no. 3: 347-51.

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: 647-55.

Gandhi, M., and M. L. Chikindas. (2007) Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, no. 1: 1-15.

Garcia-Graells, C., I. Van Opstal, S. C. M. Vanmuysen, and C. W. Michiels. (2003) The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 81, no. 3: 211-21.

Garner, M. R., B. L. Njaa, M. Wiedmann, and K. J. Boor. (2006) Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. *Infection and Immunity* 74, no. 2 (2006): 876-86.

Garrity, G. M. & Holt, J. G. (2001). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 1, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, p. 447. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.

Gay, M., and A. Amgar. (2005) Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and soft cheesem from raw milk . *Lait* 85: 153-70.

Gaya, P, M Medina, and M Nunez. (1991) Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 57, no. 11: 3355-60.

Gaya, P., C. Saralegui, M. Medina, and M. Nunez. (1996) Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in raw caprine milk. *Journal of Dairy Science* 79, no. 11: 1936-41.

Giannino, M. L., M. Aliprandi, M. Feligini, L. Vanoni, M. Brasca, and F. Fracchetti. (2009a) A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *Journal of Microbiological Methods* 78, no. 2: 181-88.

Giannino, M. L., M. Marzotto, F. Dellaglio, and M. Feligini. (2009b) Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 130, no. 3: 188-95.

Giannou, E. , A. Kakouri, Matija, Bojana Bogovi , I. Rogelj, and J. Samelis. (2009) Fate of *Listeria monocytogenes* on fully ripened greek Graviera cheese stored at 4, 12, or 25°C in air or vacuum packages: in situ PCR detection of a cocktail of bacteriocins potentially contributing to pathogen inhibition. *Journal of Food Protection* 72: 531-38.

Gillespie, I. A., J. McLauchlin, C. L Little, C. Penman, P. Mook, K. Grant, and S. J. O'Brien. (2009) Disease presentation in relation to infection foci for non pregnancy-associated human listeriosis in England and Wales, 2001-2007: Observational study. *Journal of Clinical Microbiology* JCM.00969-09.

Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-22.

Giraffa, G. (2004) Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28, no. 2: 251-60.

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: 383-91.

Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K.-D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-Del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.-M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. Mata Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.-C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Rimmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.-A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, no. 5543: 849-52.

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: 737-41.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F. and Limitone, A. (2007) Cell-cell communication in food related bacteria: 20th International ICFMH Symposium on FOOD MICRO 2006. *International Journal of Food Microbiology* 120, no. 1-2: 34-45.

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: 2802-13.

Goerges, S., U. Aigner, B. Silakowski, and S. Scherer. (2006) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 72, no. 1: 313-18.

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

Gori, K., H. D. Mortensen, N. Arneborg, and L. Jespersen. (2007) Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species. *Journal of Dairy Science* 90, no. 11: 5032-41.

Goulet, V., C. Hedberg, A. Le Monnier, and H. de Valk. (2008) Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases* 14, no. 5: 734-40.

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: 756-64.

Gravesen, A., Z. Diao, J. Voss, B. B. Budde, and S. Knochel. (2004) Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by D- and L-lactic acid. *Letters in Applied Microbiology* 39, no. 6: 528-32.

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: 233-45.

Guillier, L., V. Stahl, B. Hezard, E. Notz, and R. Briandet. (2008) Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology* 128, no. 1: 51-57.

Gysemans, K. P. M., K. Bernaerts, A. Vermeulen, A. H. Geeraerd, J. Debevere, F. Devlieghere, and J. F. Van Impe. (2007) Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 114, no. 3: 316-31.

Hamdi, T. M., M. Naim, P. Martin, and C. Jacquet. (2007) Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *International Journal of Food Microbiology* 116, no. 1: 190-193.

Heavin, S. B., O. M. Brennan, J. P. Morrissey, and C. P. O'Byrne. (2009) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by acetate, benzoate and sorbate: weak acid tolerance is not influenced by the glutamate decarboxylase system. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254.

Hein, I., A. Lehner, P. Rieck, K. Klein, E. Brandl, and M. Wagner. (2001) Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by Real-Time Quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 67, no. 7: 3122-26.

Hein, I., H. J. Jorgensen, and S. Wagner M. Loncarevic. (2005) Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by Real-Time PCR." *Research in Microbiology* 156, no. 4: 554-63.

Helinck, S., D. Le Bars, D. Moreau, and M. Yvon. (2004) Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 7: 3855-61.

Hemme, D., and C. Foucaud-Scheunemann. (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14, no. 6: 467-94.

Henri-Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Gueguen. (2004) Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in Camembert de Normandie cheese. *Lait* 84, no. 1-2: 179-89.

Henri-Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Gueguen. (2008) Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Can. J. Microbiol.* 54, no. 3: 218-228.

- Hicks, S. J., and B. M. Lund. (1991)** The survival of *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 70, no. 4: 308-14.
- Hoppe-Seyler, T.-S., B. Jaeger, W. Bockelmann, A. Geis, and K.-J. Heller. (2007)** Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. *Systematic and Applied Microbiology* 30, no. 1: 50-57.
- Hoppe-Seyler, T. S., B. Jaeger, W. Bockelmann, W. H. Noordman, A. Geis, and K. J. Heller. (2003)** Identification and differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheeses with Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). *Systematic and Applied Microbiology* 26, no. 3 (2003): 438-44.
- 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: 211-18.
- IDF. (1985)** Enumeration of coliforms. Colony count technique and most probable number technique at 30°C (milk and milk products). Standard 73A. *International Dairy Federation*
- IDF. (1988)** Code of practice for the preservation of raw milk by lactoperoxidase systems. *Bulletin N° 234*, P: 15. International Dairy Federation, Brussels, Belgium
- IDF. (1991)** Milk and milk products. Microorganisms. Colony count at 30°C. FIL-IDF Standard 100B. *International Dairy Federation*.
- IDF. (1991)** Milk and Milk Products. Yeasts and moulds. FIL-IDF Standard 94B. *International Dairy Federation*.
- Irlinger, F. (2008)** Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci: contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 126, no. 3: 302-10.
- 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: 319-28.
- 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: 457-62.
- Irlinger, F., and J. Mounier. (2009)** Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety: food biotechnology / plant biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 20, no. 2: 142-48.
- Iseppi, R., F. Pilati, M. Marini, M. Toselli, S. de Niederhölzl, E. Guerrieri, P. Messi, C. Sabia, G. Manicardi, I. Anacarso, and M. Bondi. (2008)** Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology* 123, no. 3: 281-87.

Ishikawa, M., K. Nakajima, M. Yanagi, Y. Yamamoto, and K. Yamasato. (2003) *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, no. 3: 711-20.

Ishikawa, M., K. Kodama, H. Yasuda, A. Okamoto-Kainuma, K. Koizumi, and K. Yamasato. (2007) Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Letters in Applied Microbiology* 44, no. 3: 308-13.

Isolini, D., M. Grand, and H. Glättli. (1990) Selektivmedien Zum Nachweis Von Obligat Und Fakultativ Heterofermentativen Laktobazillen. *Schweiz. Milchw. Forschung*. 19, no. 3: 57-59.

Izquierdo, E., E. Marchioni, D. Aoude-Werner, C. Hasselmann, and S. Ennahar. (2009) Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 26, no. 1: 16-20.

Jacques, N., and S. Casaregola. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts: contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 126, no. 3: 321-26.

Jakobsen, M., and J. Narvhus. (1996) Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* 6: 755-68.

Jasniewski, J., C. Cailliez-Grimal, I. Chevalot, J.-B. Millière, and A.-M. Revol-Junelles. (2009) Interactions between two carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 on target bacteria and Caco-2 Cells. *Food and Chemical Toxicology* 47, no. 4: 893-97.

Jollivet, N., M. C. Bezenger, Y. Vayssier, and J. M. Belin. (1992) Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 790-794.

Justé, A., B. P. H. J. Thomma, and B. Lievens. (2008) Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25, no. 6: 745-61.

Kagkli, D.-M., V. Iliopoulos, V. Stergiou, A. Lazaridou, and G.-J. Nychas. (2009) Differential *Listeria monocytogenes* strain survival and growth in Katiki, a traditional greek soft cheese, at different storage temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 75, no. 11: 3621-26.

Kells, J., and A. Gilmour. (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation." *International Journal of Food Microbiology* 91, no. 2: 167-74.

Kinderlerer, J. L., and B. M. Lund. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by hexanoic and octanoic acids. *Letters in Applied Microbiology* 14, no. 6: 271-74.

- 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, R. (1993)** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *Microbiology Reviews* 12: 39-86.
- Kolloffel, B., L. Meile, and M. Teuber. (1999)** Analysis of brevibacteria on the surface of Gruyere cheese detected by in situ hybridization and by colony hybridization. *Letters in Applied Microbiology* 29, no. 5: 317-22.
- Kongo, J. M., F. X. Malcata, A. J. Ho, and M. Wiedmann. (2006)** Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) cheese production." *Journal of Dairy Science* 89, no. 11: 4456-61.
- Kongo, J. M., A. M. Gomes, F. X. Malcata, and P. L. H. McSweeney. (2009)** Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of Sao Jorge - a raw milk cheese of the Azores (Portugal). *Food Chemistry* 112, no. 1: 131-38.
- Konteles, S., V. J. Sinanoglou, A. Batrinou, and K. Sflomos. (2009)** Effects of [Gamma]-irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. *Food Microbiology* 26, no. 2: 157-65.
- Kranenburg, R. van, M. Kleerebezem, J. van Hylckama-Vlieg, B. M. Ursing, J. Boekhorst, B. A. Smit, E. H. E. Ayad, G. Smit, and R. J. Siezen. (2002)** Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria : predictions from genome sequence analysis." *International Dairy Journal* 12: 111-21.
- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. (1997)** Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35, no. 5: 1216-23.
- Lafarge, V., J. C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J. Y. Leveau, and A. S. Delacroix-Buchet. (2004a)** Le potentiel de la TGGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. *Lait* 84, no. 1-2: 169-78.
- Lafarge, V., J.-C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.-Y. Leveau, A. Gruss, and A. Delacroix-Buchet. (2004b)** Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 9: 5644-50.
- Lanciotti, R., F. Patrignani, F. Bagnolini, M. E. Guerzoni, and F. Gardini. (2003)** Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology* 20, no. 5 (2003): 537-43.
- Larpin, S., C. Bonaiti, N. Bora, R. Gelsomino, S. Goerges and N. Desmasures. (2004)** Surface microflora of Livarot, a traditional smear ripened cheese. *The SCM project (QLK1-CT-2001-02228)*
- Larpin, S., C. Mondoloni, S. Goerges, J. P. Vernoux, M. Guéguen, and Nathalie Desmasures. (2006)** *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a french red-smear cheese. *FEMS Yeast Research* 6: 1243-53.

- Larsen, A. G., and S. Knechel.** (1997) Antimicrobial activity of food-related *Penicillium sp.* against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. *Journal of Applied Microbiology* 83, no. 1: 111-19.
- Latorre, A. A., J. A. S. Van Kessel, J. S. Karns, M. J. Zurakowski, A. K. Pradhan, R. N. Zadoks, K. J. Boor, and Y. H. Schukken.** (2009) Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology* 75, no. 5: 1315-23.
- 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: 219-37.
- 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: 271-81.
- Leisner, J. J., B. G. Laursen, H. Prévost, D. Drider and P. Dalgaard.** (2007) *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews* 31, no. 5: 592-613.
- Leistner, L.** (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, no. 1-3: 181-86.
- Leistner, L., and L. G. M. Gorris.** (1995) Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology* 6, no. 2: 41-46.
- Lemaire, V., O. Cerf, and A. Audrier.** (1989) Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Immunol Hungarica* 36, no. 2-3: 281-84.
- Lin, W.-F., and D.-F. Hwang.** (2007) Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* 18, no. 9: 1050-1057.
- Linton, M., A. B. Mackle, V. K. Upadhyay, A. L. Kelly, and M. F. Patterson.** (2008) The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, no. 4: 423-28.
- Little, C. L., J. R. Rhoades, S. K. Sagoo, J. Harris, M. Greenwood, V. Mithani, K. Grant, and J. McLauchlin.** (2008) Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology* 25, no. 2: 304-12.
- 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: 1697-705.
- Liu, L., P. Conner, P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross.** (2007) Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 104, no. 4: 1059-66.
- Loessner, M., S. Guenther, S. Steffan, and S. Scherer.** (2003) A Pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese

surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 3: 1854-57.

Lopandic, K., S. Zelger, L. K. Banzky, F. Eliskases-Lechner, and H. Prillinger. (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* 23, no. 4: 341-50.

Lund, F., O. Filtenborg, and J. C. Frisvad. (1995) Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology* 12: 173-80.

MacDonald, P.D.M., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., Saah, J.R., Graves, L.M., Hunter, S.B. and J. Sobel. (2005) Outbreak of Listeriosis among mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced mexican style cheese. *Clinical Infectious Diseases* 40, no. 5: 677-82.

Macedo, A. C., and F. X. Malcata. (1997a) Changes of lactose, lactic acid, and acetic acid contents in Serra cheese during ripening. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204, no. 6: 453-55.

Macedo, A. C., and F. X. Malcata. (1997b) Role of adventitious microflora in proteolysis and lypolysis of Serra cheese : preliminary screening. *Z. Lebensm Unters Forsch A* 205: 25-30.

Macedo, A. C., F. X. Malcata, and T. A. Hogg. (1995) Microbiological profile in Serra ewes' cheese during ripening. *Journal of Applied Microbiology* 79, no. 1: 1-11.

Maisnier-Patin, S., N. Deschamps, SR. Tatini, and J. Richard. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72: 249-63.

Manfreda, G., A. De Cesare, S. Stella, M. Cozzi, and C. Cantoni. (2005) Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 102, no. 3: 287-93.

Mannu, L., A. Paba, M. Pes, and M. F. Scintu. (2000) Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology* 89, no. 2: 191-97.

Manolopoulou, E., P. Sarantinopoulos, E. Zoidou, A. Aktypis, E. Moschopoulou, I. G. Kandarakis, and E. M. Anifantakis. (2003) Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 82, no. 2: 153-61.

Mansour, S. , J. M. Beckerich, and P. Bonnarme. (2008) Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74, no. 21 (2008): 6505-12.

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: 4012-18.

- Marcellino, N., and D. R. Benson. (1992)** Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese. *Applied and Environmental Microbiology*: 3448-54.
- Martin-Platero, A. M., E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Martinez-Bueno. (2009)** Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 132, no. 1: 24-32.
- Masson, F., R. Talon, and M. C. Montel. (1996)** Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* 32, no. 1-2: 199-207.
- 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: 2212-16.
- Mateos, M. and T. A. Markow. (2005)** Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae). *BMC Evolutionary Biology* 5: 46.
- 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.
- Mayr, R., M. Fricker, A. Maoz, and S. Scherer. (2004)** Anti-listerial activity and biodiversity of cheese surface cultures: influence of the ripening temperature regime. *European Food Research and Technology* 218, no. 3: 242-47.
- Mellefont, L. A., T. A. McMeekin, and T. Ross. (2008)** Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology* 121, no. 2: 157-68.
- Meyer-Broseta, S., A. Diot, S. Bastian, J. Riviere, and O. Cerf. (2003)** Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk." *International Journal of Food Microbiology* 80, no. 1: 1-15.
- Michel, V., A. Hauwuy, and J. F. Chamba. (2001)** La Flore Microbienne des laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81, no. 5: 575-92.
- Millet, L., M. Saubusse, R. Didiene, L. Tessier, and M. C. Montel. (2006)** Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 108, no. 1: 105-14.
- Millière, J. B., M. Michel, F. Mathieu, and G. Lefebvre. (1994)** Presence of *Carnobacterium spp.* in french surface mould-ripened soft-cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 264-69.
- 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, no. 2: 169-84.
- Monnet, C., K. Correia, A.-S. Sarthou, and F. Irlinger. (2006)** Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72, no. 11: 6972-79.

Monnet, C., Bleicher, A., Neuhaus, K., Sarthou, A-S., Leclercq-Perlat, M-N., and F. Irlinger. (2010) Assessment of the anti-listerial activity of microfloras from the surface of smear-ripened cheeses. *Food Microbiology* 27, no. 2:302-310.

Morales, P., E. Fernandez-Garcia, P. Gaya, and M. Nuñez. (2003a) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese." *International Dairy Journal* 13: 201-9.

Morales, P., E. Fernández-García, and M. Nuñez. (2003b) Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology* 37, no. 5: 410-414.

Morales, P., E. Fernandez-Garcia, and M. Nunez. (2005) Volatile compounds produced in cheese by *Pseudomonas* strains of dairy origin belonging to six different species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, no. 17: 6835-43.

Morea, M., F. Baruzzi, and P. S. Cocconcelli. (1999) Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology* 87, no. 4: 574-82.

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: 217-21.

Motta, AS., and A. Brandelli. (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 92, no. 1: 63-70.

Motta, A. S., and A. Brandelli. (2003) Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62, no. 2: 163-67.

Motta, A., and A. Brandelli. (2008) Properties and antimicrobial activity of the smear surface cheese coryneform bacterium *Brevibacterium linens*. *European Food Research and Technology* 227, no. 5: 1299-306.

Mounier, J. , R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan. (2005) Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 71, no. 11: 6489-500.

Mounier, J. , M. C. Rea, P. M. O'Connor, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan. (2007) Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73, no. 23: 7732-39.

Mounier, J., C. Monnet, N. Jacques, A. Antoinette, and F. Irlinger. (2009) Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *International Journal of Food Microbiology* 133, no. 1-2: 31-37.

Mulder, E. G., and J. Antheunisse. (1963) Morphologie, physiologie et écologie des *Arthrobacter*. *Annales De l'Institut Pasteur* 105: 46-74.

Murray, E. G. D., R. A. Webb and M. B. R. Swann. (1926) A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29, no. 4: 407-439.

Naghmouchi, K., E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss. (2007) Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 24, no. 7-8: 718-27.

Nelson, K. E., D. E. Fouts, E. F. Mongodin, J. Ravel, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, D. A. Rasko, S. V. Angiuoli, S. R. Gill, I. T. Paulsen, J. Peterson, Owen White, W. C. Nelson, W. Nierman, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madupu, D. H. Haft, J. Selengut, S. Van Aken, H. Khouri, N. Fedorova, H. Forberger, B. Tran, S. Kathariou, L. D. Wonderling, G. A. Uhlich, D. O. Bayles, J. B. Luchansky, and C. M. Fraser. (2004) Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Research* 32, no. 8: 2386-95.

NF V04-054 (1988) AFNOR. Viandes et produits à base de viande. Dénombrements des Pseudomonas. Standard NF V 04-054. Association Française de Normalisation (AFNOR).

O'Driscoll, B., C. G. Gahan, and C. Hill. (1996) Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62, no. 5: 1693-98.

O'Sullivan, L., E. B. O'Connor, R. P. Ross, and C. Hill. (2006) Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 100, no. 1: 135-43.

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: 3691-701.

Ogier, J.-C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.-Y. Leveau, and A. Delacroix-Buchet. (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 9: 5628-43.

Ogier, J.-C., E. Casalta, C. Farrokh, and A. Saïhi. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus: contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products." *International Journal of Food Microbiology* 126, no. 3: 286-90.

Ogier, J.-C., and P. Serror. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus: contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 126, no. 3: 291-301.

Ortiz De Apocada M. J., Selgas M. D., and J. A. Ordonez. (1993) Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Research International* 26, no. 5: 319-325.

- Ostling, C. E., and S. E. Lindgren. (1993)** Inhibition of Enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *Journal of Applied Microbiology* 75, no. 1: 18-24.
- 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: 267-71.
- Papageorgiou, D. K., and E. H. Marth. (1989a)** 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: 625-30.
- Papageorgiou, D. K., and E. H. Marth (1989b)** Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *Journal of Food Protection* 52, no. 2: 82-87.
- Papageorgiou, D. K., and E. H. Marth. (1989c)** Fate of *L. monocytogenes* during the manufacture and ripening of blue cheese. *Journal of Food Protection* 52 : 459
- Petrone, G., M. P. Conte C. Longhi S. di Santo F. Superti M. G. Ammendolia P. Valenti L. Seganti. (1998)** Natural milk fatty acids affect survival and invasiveness of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 27, no. 6: 1362-368.
- Pinto, B., and D. Reali. (1996)** Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other Listerias in Italian-made soft cheeses. *Zentralblatt Fur Hygiene Und Umweltmedizin* 199, no. 1: 60-68.
- Place, R. B., D. Hiestand, S. Burri, and M. Teuber. (2002)** *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 25, no. 3: 353-9.
- Place, R. B., Hiestand, D., Gallmann, H. R. and Teuber, M. (2003)** *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 26, no. 1: 30-37.
- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J-P., and M.Guéguen. (2008)** Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*: Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 126, no.3: 327-332.
- Powell, M., W. Schlosser, and E. Ebel. (2004)** Considering the complexity of microbial community dynamics in food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 90, no. 2: 171-79.
- Powell, S.M., Riddle, M.J., Snape, I., Stark, J.S. (2005)** Location and DGGE methodology can influence interpretation of field experimental studies on the response to hydrocarbons by Antarctic benthic microbial community. *Antarctic Sci.* 17, 353–360.
- Psoni, L., C. Kotzamanides, C. Andrighetto, A. Lombardi, N. Tzanetakis, and E. Litopoulou-Tzanetaki. (2006a)** Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 109, no. 1-2

- Psoni, L., N. Tzanetakis, and E. Litopoulou-Tzanetaki. (2006b)** Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food Control* 17, no. 7: 533-39.
- Psoni, L., N. Tzanetakis, and E. Litopoulou-Tzanetaki. (2003)** Microbiological characteristics of Batzos, a traditional greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology* 20, no. 5: 575-82.
- Rademaker, J. L. W., M. Peinhopf, L. Rijnen, W. Bockelmann, and W. H. Noordman. (2005)** The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *International Dairy Journal* 15, no. 6-9: 785-94.
- 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.
- Randazzo, C. L., E. E. Vaughan, and C. Caggia. (2006)** Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* 109, no. 1-2: 1-8.
- Randazzo, C.L., Caggia, C., Neviani, E. (2009)** Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods* 78, no. 1: 1-9.
- Rantsiou, K., V. Alessandria, R. Urso, P. Dolci, and L. Cocolin. (2008)** Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by Quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 121, no. 1: 99-105.
- Rea, M. C., S. Gorges, R. Gelsomino, N. M. Brennan, J. Mounier, M. Vancanneyt, S. Scherer, J. Swings, and T. M. Cogan. (2007)** Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *Journal of Dairy Science* 90, no. 5: 2200-2210.
- Robbins J. B., Fisher C. W., Moltz A. G., and Martin S. E. (2005)** Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection* 68: 494-498.
- Roche, S. M., P. Gracieux, E. Milohanic, I. Albert, I. Virlogeux-Payant, S. Temoin, O. Grepinet, A. Kerouanton, C. Jacquet, P. Cossart, and P. Velge. (2005)** Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, no. 10: 6039-48.
- 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.

Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M., Medina, M. (2000) Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10, no. 1-2: 7-15.

Rodriguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, A. Suarez and P. E. Hernandez. (1995) PCR detection of the lactococcin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 61, no. 7: 2802-2805.

Rosenow, E. C. (1919) Studies on elective localization. *J. Dent. Research* 1:205-249.

Roth, E., Miescher Schwenninger, S., Hasler, M., Eugster-Meier, E., Lacroix, C. (2010) Population dynamics of two antilisterial cheese surface consortia revealed by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *BMC Microbiology* 10, no. 1.

Rudi, K., S. L. Flateland, J. F. Hanssen, G. Bengtsson, and H. Nissen. (2002) Development and evaluation of a 16S ribosomal DNA array-based approach for describing complex microbial communities in ready-to-eat vegetable salads packed in a modified atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68, no. 3: 1146-56.

Rudi, K., K. Naterstad, S. m. Dromtorp, and H. Holo . (2005) Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on Gouda-like cheeses by Real-Time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 40, no. 4: 301-6.

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., and E. H. Marth. (1987a) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening Camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50, no. 5: 372-78.

Ryser, E. T., and E. H. Marth. (1987b) Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 50, no. 1: 7-13.

Ryser, E. T. (1999) Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other dairy products. *Listeria , Listeriosis and Food Safety*. 2nd edition. Edited by Elliot T. Ryser, Elmer H. Marth. Chapter 11.

Sanchez, J. I., L. Rossetti, B. Martinez, A. Rodriguez, and G. Giraffa. (2006) Application of Reverse Transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal of Microbiological Methods* 65, no. 2: 268-77.

Sanchez, I., S. Sesena, J. M. Poveda, L. Cabezas, and L. Palop. (2006) Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology* 107, no. 3: 265-73.

Sarantinopoulos, P., G. Kalantzopoulos, and E. Tsakalidou. (2001) Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Applied and Environmental Microbiology* 67, no. 12: 5482-87.

Saubusse, M. (2007) Effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand, 2007.

Saubusse, M., L. Millet, C. Delbes, C. Callon, and M. C. Montel. (2007) Application of Single Strand Conformation Polymorphism - PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116, no. 1: 126-35.

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.

Seeliger, H. P. R. And K. Hohne. (1979) Serotyping *Listeria monocytogenes* and related species. H. P. R. Seeliger and K. Hohne. *Methods in Microbiology*. Volume 13. Chapter II. Edited by T. Bergan and J. R. Norris. Academic Press, London, 1979.

Seifu, E., E. M. Buys, and E. F. Donkin. (2005) Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology* 16, no. 4: 137-54.

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: 591-96.

Smit, G., A. Verheul, R. van. Kranenburg, E. Ayad, R. Siezen, and W Engels. (2000) Cheese flavour by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International* 33, no. 3/4: 153-60.

Smit, G., B. A. Smit, and W. J. M. Engels. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29, no. 3: 591-610.

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: 149-53.

Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, no. 2: 479-91.

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: 483-88.

Swaminathan, B., and P. Gerner-Smidt. (2007) The epidemiology of human listeriosis: forum on *Listeria* - from genomics to pathogenesis. *Microbes and Infection* 9, no. 10: 1236-43.

Tabouret, M., J. De Rycke, A. Audurier, and B. Poutrel. (1991) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to Listeriolysin production. *Journal of Medical Microbiology* 34, no. 1: 13-18.

Tagg, J. R. , and A. R. McGiven. (1971) Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21, no. 5: 943.

Takeuchi M., N. Weiss, P. Schumann and A. Yokota. (1996) *Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic Gram-positive, nonsporulating rod with 2,4-Diarninobutyric Acid in the cell wall. *International Journal of Sytematic Bacteriology* 46, no. 4: 967-971.

Theveny, L. and M. C. Montel. (2007) Etudes des flores de surface en AOC St Nectaire et sélection d'un écosystème simplifié. Projet St Nectaire.

Tilney, L.G. and D.A. Portnoy. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*, J. Cell Biol. 109: 1597-1608.

Teixeira de Carvalho, A. A., R. Aparecida de Paula, H. C. Mantovani, and C. Alencar de Moraes. (2006) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from italian salami. *Food Microbiology* 23, no. 3: 213-19.

Torkar, K. G., and A. Vengust. (2008) The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19, no. 6: 570-577.

Valdes-Stauber, N., H. Gotz, and M. Busse. (1991) Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *International Journal of Food Microbiology* 13, no. 2: 119-30.

Valdes-Stauber, N., and S. Scherer. (1994) Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, no. 10: 3809-14.

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: 115-29.

Van Kessel, J. S., J. S. Karns, L. Gorski, B. J. McCluskey, and M. L. Perdue. (2004) Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US Dairies. *Journal of Dairy Science* 87, no. 9: 2822-30.

Vandamme, E. J. (2003) Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Diversity* 13: 153-66.

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: 469-76.

Vermeulen, A., K. P. M. Gysemans, K. Bernaerts, A. H. Geeraerd, J. Debevere, F. Devlieghere, and J. F. Van Impe. (2009) Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic

acid. *International Journal of Food Microbiology* 135, no. 2: 83-89.

Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy, H. Meugnier, M. Bes, Y. Lasne, F. Fiedler, J. Etienne, and J. Freney. (2000) *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 50 Pt 4: 1521-27.

Vilar, M. J., E. Yus, M. L. Sanjuan, F. J. Dieguez, and J. L. Rodriguez-Otero. (2007) Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science* 90, no. 11: 5083-88.

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: 357-60.

Voegas, C. A., and I. Sa-Correia. (1991) Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic. *Journal of General Microbiology* 137 (1991): 645-51.

Wagner, Michael, Hauke Smidt, Alexander Loy, and Jizhong Zhou. (2007) Unravelling microbial communities with DNA-microarrays: challenges and future directions. *Microbial Ecology* 53, no. 3: 498-506.

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: 273-80.

Wang, L. L. , and E. A. Johnson. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology* 58, no. 2: 624-29.

Wenzel, J. M., and E. H. Marth. (1990) Changes in populations of *Listeria monocytogenes* in a medium with internal pH control containing *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* 73: 3357-3365.

Witzig, R., H. Hecht H. J. Junca, and D. H. Pieper. (2006) Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Applied and Environmental Microbiology* 72, no. 5: 3504-14.

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: 3351-56.

Yvon, M., and L. Rijnen. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11, no. 4-7: 185-201.

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.

Annexe 1

Conditions de culture, de conservation et de décongélation des souches microbiennes utilisées pour reconstituer les consortiums.

Groupe	Espèces microbienne	Conditions de culture			Reprise des cultures après centrifugation	Répartition en cryotubes	Congélation	Décongélation
		bouillon	T°C	temps (jours)				
A = Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	MRS	30	2				
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	MRS	30	2	Lait glycérolé (15%)			
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BHI / MRS	30	3	additionné de 0,5% d'ascorbate			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	M17	42	2				
	<i>Carnobacterium mobile</i>	BHI	25	3				
	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	BHI	25	3				
	<i>Arthrobacter nicotianae</i> ou <i>arilaitensis</i>	BHI	25	4 à 5				
	<i>Arthrobacter ardleyensis</i> ou <i>bergerei</i>	BHI	25	4 à 5			5 min dans un bain-marie à 30°C	
	<i>Staphylococcus pulvereri</i>	BHI	37	2	Lait glycérolé (15%)	1,5 mL de suspension par microtube -		
	<i>Staphylococcus xyloso</i>	BHI	37	2	additionné de 0,5% d'ascorbate	temps de contact de la suspension microbienne avec le glycérol de 15 à 30 min	passage de la température ambiante à -80°C directement	
B = Bactéries à Gram positif et catalase positive	<i>Brevibacterium linens</i> ou <i>casei</i>	BHI	25	4 à 5				
	<i>Brevibacterium antiqum</i> ou <i>casei</i>	BHI	25	4 à 5				
	<i>Brachybacterium sp.</i>	BHI	25	4 à 5				
	<i>Proteus vulgaris</i>	BHI	30	2				
	<i>Serratia proteomaculans</i>	BHI	30	2	Lait glycérolé (15%)			
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ou <i>syringae</i>	BHI	30	2				
C = Bactéries à Gram négatif	<i>Candida sake</i>	YPG	25	3 à 4				
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	YPG	25	3 à 4	Lait glycérolé (15%)			
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	YPG	25	3 à 4				
	<i>Geotrichum sp.</i>	YPG	25	3 à 4				
	<i>Mucor sp.</i> (poils ras)	gélose inclinée OGA	25	5 à 10	Récolte des spores dans du Lait glycérolé (15%)		5 min dans un bain-marie à 37°C	
D = Levures	<i>Mucor sp.</i> (poils longs)	gélose inclinée OGA	25	5 à 10			5 min dans un bain-marie à 30°C	

Annexe 2

Compositions des milieux de cultures

Milieu fromager gélosé (pH = 7,00)

Objet, domaine d'application et principe de la méthode _____

Le milieu fromager est utilisé pour la culture des microorganismes isolés de matrices fromagères (cœur ou surface du fromage) afin d'étudier la potentialité des souches à consommer des sucres et à produire ou consommer des acides organiques.

Un ou plusieurs substrats carbonés sont ajoutés extemporanément au milieu avant inoculation du microorganisme d'intérêt et incubation. Les substrats résiduels et les acides organiques produits peuvent ensuite être dosés.

Documents de référence _____

Communication personnelle de Valérie Stahl dans le cadre du programme ANR Gram. Modifications apportées par Robert Didienne (URF, Aurillac, France).

Préparation _____

Composants pour un litre de milieu :

Eau distillée	1 L
Caséinate de Sodium	12 g
Peptone de Caséine	3 g
Extrait de levure	1 g
CaCl	0,1 g
MgSO ₄	0,5 g
NaCl	20 g

Agar bactériologique 12 g

Substrat carboné 2 g/L (des solutions à 10% sont préparées puis autoclavées 15 min à 120°C)

Les composants sont mis en suspension et le pH ajusté à 7,00 avec de la soude (NaOH, 1N). Le milieu est ensuite stérilisé à 121°C pendant 15 min.

Important : le milieu doit être bien homogénéisé dès la sortie de l'autoclave avant d'être coulé en boîte de pétri.

15 mL de milieu + 0,3 mL de substrat sont coulées par boîte de pétri puis laissées à solidifier. Après solidification, le milieu est ensemencé avec 0,1 mL d'inoculum.

Incubation et lecture _____

Les boîtes sont incubées à 20°C.

Toutes les colonies sont dénombrées. Le milieu peut être récolté pour extraction des sucres et acides organiques.

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 compléter 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 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 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-.

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 SO₄, H₂O
- 0,1 g de Mg SO₄, 7H₂O
- 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 compléter 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 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 piméricine 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 KH_2PO_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 piméricine (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 RPF : Rabbit Plasma Fibrinogen

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 agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 mins à 121°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec la totalité de 10 flacons de lyophilisat de supplément sélectif (BS 03408) replit 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.

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) repris 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.

GÉLOSE 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.

Annexe 3

Publications, Communications

Publications périodiques à comité de lecture_____

Retureau E, Callon C, Didienne R, Montel M. C. (2010) Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? *Dairy Science and Technology* doi:10.1051/dst/2010010

Communications courtes dans congrès sous forme de posters_____

Retureau E, Callon C, Didienne R, Montel M. C. (2009) Inhibition of *Listeria monocytogenes* at the surface of cheeses by natural consortium from Saint-Nectaire cheeses and reconstituted consortium. FIL-IDF Semaine Science et Technologie du Lait – 20 au 24 avril 2009 – Rennes - France

Retureau, E., C. Callon, M.C. Montel – (2008) Inhibition of *Listeria monocytogenes* at the surface of cheese –5th IDF SYMPOSIUM ON CHEESE RIPENING ; Bern Switzerland

Communications orales_____

Retureau E, Callon C, Didienne R, Montel M. C. Inhibition de *Listeria monocytogenes* à la surface des fromages type pâte pressée non cuite (St Nectaire) – Journées de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand, mai 2009

Retureau E., Callon C., Didienne, R., Buchin, S., Montel, MC. (2009) Is microbial diversity a trump for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses ? - FIL-IDF Semaine Science et Technologie du Lait – 20 au 24 avril 2009 – Rennes - France

Callon C., Retureau E., Didienne R., Lavigne R., Desserre B., Montel M.C. (2009) Quelles populations microbiennes peuvent faire barrière à *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite ? – Journée de restitution des travaux de l'UMT TREFL et du projet européen TRUEFOOD – 3 juin 2009 – Aurillac – France.

Réunions WP2A dans le cadre du programme TRUEFOOD, 2009 et 2007.

RESUME

L'objectif était de déterminer si la biodiversité des espèces microbiennes peut contribuer à la maîtrise de *Listeria monocytogenes* à la surface de fromages au lait cru. La stratégie reposait sur le criblage de communautés microbiennes de croûtes de fromages St Nectaire fermiers puis la reconstitution de communautés de composition plus simplifiée. Dix consortiums microbiens naturellement présents à la surface de ces fromages au lait cru sur trente quatre testés les auto protégeaient contre *L. monocytogenes*. Le consortium de croûte le plus inhibiteur, composé de 8 espèces de bactéries lactiques dont *Brochothrix thermosphacta*, *Marinilactibacillus psychrotolerans* et *Carnobacterium mobile* peu fréquentes dans les produits laitiers, 12 espèces de bactéries à Gram positif et catalase positive, 10 espèces de bactéries à Gram négatif, 4 espèces de levures et 3 moisissures, était difficile à reconstituer. Par méthodes cultures dépendantes et indépendantes (Single Strand Conformation Polymorphism) il a été montré qu'en cours d'affinage les profils bactériens du consortium naturel était plus divers que ceux des consortiums reconstitués. Néanmoins, un consortium simplifié composé de flores cultivables sur un milieu «Brain Heart Infusion» et caractérisé par la présence de bactéries à Gram négatif et la dominance, notamment en fin d'affinage, d'espèces halophiles *Brochothrix*, *Carnobacterium* et *Marinilactibacillus*, était presque aussi inhibiteur que le consortium complexe. L'inhibition par ce consortium serait essentiellement associée à la production d'acide lactique en début d'affinage et d'acide acétique en fin d'affinage. Elle pourrait être contrecarrée par une consommation de lactate par les levures.

Listeria monocytogenes / diversité microbienne / fromages / lait cru

SUMMARY

The objective aimed at determining if microbial diversity can be an asset to guarantee the microbial safety of raw milk cheeses against *Listeria monocytogenes*. The strategy was to screen microbial communities of St Nectaire's rind cheeses with anti-listerial properties, then to reconstitute communities of more simplified composition. Ten microbial consortia naturally present on the surface of raw milk cheeses out of thirty four tested can self-protect against *L. monocytogenes*. The most inhibitory complex consortium was constituted by 8 species of lactic bacteria, among them some are not frequent in dairy products *Brochothrix thermosphacta*, *Marinilactibacillus psychrotolerans* and *Carnobacterium mobile*, 12 species of Gram positive and catalase positive bacteria, 10 species of Gram negative bacteria, 4 species of yeasts and 3 molds. It was difficult to reconstitute. The results from plate counting and analysis by single strand conformation polymorphism (SSCP) converged to show that bacterial profiles from natural consortium were more diverse than the defined consortia. Nevertheless, a simplified consortium composed of bacteria growing on "Brain Heart Infusion" medium and characterized by the presence of Gram negative bacteria and the dominance of *Brochothrix*, *Carnobacterium* and *Marinilactibacillus* in particular at the end of ripening, was nearly as inhibitory as the complex consortium. The inhibition by this consortium was essentially associated with the production of lactic acid in the beginning of ripening and acetic acid at the end of ripening. The inhibition could be impaired by the consumption of lactate by yeasts.

Listeria monocytogenes / microbial diversity / cheese / raw milk