



HAL
open science

Sélection et assemblage d'agents bioprotecteurs pour la maîtrise des sérovars de *Salmonella enterica* retrouvés en Normandie dans la filière fromagère AOP au lait cru : application au Camembert de Normandie

Alexandra Besnard

► To cite this version:

Alexandra Besnard. Sélection et assemblage d'agents bioprotecteurs pour la maîtrise des sérovars de *Salmonella enterica* retrouvés en Normandie dans la filière fromagère AOP au lait cru : application au Camembert de Normandie. Sciences agricoles. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC203 . tel-03920283

HAL Id: tel-03920283

<https://theses.hal.science/tel-03920283v1>

Submitted on 3 Jan 2023

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Sélection et assemblage d'agents bioprotecteurs pour la maîtrise des sérovars de *Salmonella enterica* retrouvés en Normandie dans la filière fromagère AOP au lait cru : application au Camembert de Normandie

**Présentée et soutenue par
Alexandra BESNARD**

**Thèse soutenue publiquement le 07/01/2021
devant le jury composé de**

M. EMMANUEL COTON	Professeur des universités, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur du jury
Mme MONIQUE ZAGOREC	Directeur de recherche, INRAE Oniris-Nantes	Rapporteur du jury
Mme SANDRA HELINCK	Maître de conférences, AgroParisTech	Membre du jury
Mme MARGOT SCHLUSSELHUBER	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme NATHALIE DESMASURES	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. ALAIN RINCE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury

Thèse dirigée par NATHALIE DESMASURES, Aliments bioprocédés toxicologie environnements



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



«間違いは**進歩**の**障害**ではありませんが、
私たちが**誰**であるかの**基盤**そのものです.»

Mavis Vermillon -

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier l'ensemble de la filière AOP, la région Normandie et l'Europe pour avoir financé ce projet de recherche via des fonds FEDER.

Aux membres du jury,

Pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ma thèse. Merci au Docteur Monique Zagorec et au Professeur Emmanuel Coton pour avoir accepté d'être les rapporteur·ice·s de cette thèse. Merci au Docteur Sandra Helinck et au Professeur Alain Rince d'avoir accepté d'être examinateur·ice·s. Merci à Aurélie Collec pour avoir accepté d'être membre invité.

À ma directrice de thèse, le Pr Nathalie Desmasures,

Pour m'avoir accompagnée pendant ces trois ans de thèse. Merci de m'avoir transmis la passion du fromage. Merci aussi pour m'avoir appris à être plus rigoureuse, et « force de proposition ».

À ma co-encadrante, Margot Schlüsselhuber,

Merci d'avoir su trouver les mots quand j'en avais besoin. Merci pour ta rigueur et tes conseils, que ce soit au laboratoire ou pour la rédaction.

Au professeur Patrick Lucas,

Merci pour m'avoir fourni des souches pour cette étude. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Aux membres de l'équipe MALIM,

Merci pour les pauses cafés quotidiennes, les dégustations de fromage, cidre et gâteaux tout au long de l'année. Merci pour les conseils, encouragements et l'entraide au laboratoire.

Merci aux stagiaires, doctorant·e·s et post-doctorant·e·s de passage, et à ceux·elles qui sont toujours là. Ces trois années furent rythmées en émotions.

Merci à Yohan, parti bien trop vite, pour nos aventures assez épiques, nos rires et notre passion des chats.

Merci à Pierre, pour avoir rejoint le club des doctorants, pour les discussions sur nos thèses, ou encore les petites anecdotes croustillantes. Courage pour ta thèse !

A la plateforme PLATIN',

Merci pour votre implication dans ce projet. Un merci tout particulier à Fanny qui m'a été d'une grande aide et a toujours été présente pour répondre à mes questions.

À l'entreprise Gillot,

Pour m'avoir accueillie au sein de leurs locaux et m'avoir partagé leur savoir sur la fabrication du célèbre Camembert au lait cru. J'espère un jour voir la mention « fait avec les agents bioprotecteurs d'Alexandra Besnard » dans le rayon du supermarché.

À mes êtres chers,

Merci, merci, merci ! Elo, Camille... Je n'aurais jamais pu faire cette thèse sans vous, sans votre soutien infaillible.

Elo, vivre la même aventure, si on peut appeler ça une aventure, m'a vraiment aidé. Pouvoir partager nos galères, manips foireuses, baisse de moral, tout comme les bons moments c'était un peu comme avoir quelqu'un derrière moi avec une pancarte « YOU CAN DO IT ». Je n'oublierais pas nos discussions agrémentées de laines, fanfics, et autres contenus qu'il vaut mieux taire ici... Merci pour les séjours à Tours et pour avoir toujours dit « oui » quand que je voulais un Starbucks.

Camille, notre Parisienne préférée, tu t'es tellement impliquée dans nos thèses que j'ai l'impression que je pourrais te mettre dans les auteurs ! Merci de nous avoir supportées pendant 3 ans, merci pour ton soutien, tes idées et ta disponibilité pour les tâches ingrates (genre relire une thèse...). Merci pour ces discussions pleines de photos de nos chats, de tes messages vocaux racontant tes histoires toujours plus incroyables les unes que les autres (y a qu'à toi que ça arrive que le mec de Quitoque t'oublie !).

À ma famille,

Pour avoir toujours cru en moi et ma réussite, pour m'avoir poussé même dans les moments difficiles, pour avoir été « fiers » de moi. Avec vous je sais que je ne serais jamais seule.

À ma petite Maman, pour avoir toujours tout sacrifié pour ma réussite, pour les heures de discussions lors de mes moments de doute, pour cette énergie positive inébranlable. Merci pour avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

À ma sœur, pour m'avoir toujours encouragée pendant ces trois ans. Merci pour ces soirées film de Noël, jeux de société, pour nos séances de sports et de cuisine avec Cyril Lignac ! Merci pour être ma petite sœur, tout simplement.

À Naya et Fuzi, qui oui, font partie de la famille. Je n'imagine plus ma vie sans mes deux petites boules de poils qui prennent bien de trop place dans mon lit.

Je vous aime.

À mon pilier, Hakim,

Pour m'avoir supporté pendant cette thèse, que ce soit par mon humeur ou mes changements capillaires déstabilisants (ce n'est que le début... !). Merci d'avoir su m'apaiser, me booster et d'avoir toujours su trouver les mots justes.

Sommaire

PREAMBULE	1
CHAPITRE I : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère	5
1. La matrice lait cru	5
1.1. Caractéristiques physico-chimiques	5
1.1.1. <i>Les lipides</i>	6
1.1.2. <i>Les protéines</i>	6
1.1.3. <i>Les matières azotées non protéiques</i>	8
1.1.4. <i>Les minéraux, oligo-éléments et vitamines</i>	9
1.2. Composition microbienne	12
1.2.1. <i>Bactéries lactiques</i>	15
1.2.2. <i>Bactéries d'affinage</i>	16
1.2.3. <i>Levures et moisissures</i>	16
1.2.4. <i>Bactéries à Gram négatif</i>	17
2. Les fromages au lait cru	19
2.1. Positionnement de la filière fromagère française dans le monde	19
2.2. Les fromages au lait cru en Normandie	20
2.2.1. <i>Le Pont l'évêque</i>	20
2.2.2. <i>Le Livarot</i>	20
2.2.3. <i>Le Neufchâtel</i>	21
2.2.4. <i>Le Camembert de Normandie</i>	21
2.2.4.1. Fabrication du Camembert de Normandie AOP : spécificités	21
2.2.4.2. Processus de fabrication	24
2.2.4.3. Composition microbienne et flore d'intérêt technologique	26
2.2.4.3.1. Les bactéries lactiques	27
2.2.4.3.2. Les levures et moisissures	28
2.2.4.3.3. Les bactéries acido-sensibles	29
2.3. Contamination des produits laitiers par des bactéries potentiellement pathogènes	30
CHAPITRE II : Les <i>Salmonella</i> en environnement laitier	33
1. Caractéristiques générales du genre <i>Salmonella</i>	33
1.1. Taxonomie et nomenclature du genre <i>Salmonella</i>	33
1.2. Morphologie, caractères cultureux et biochimiques du genre <i>Salmonella</i>	34
1.3. Pathogénicité et épidémiologie du genre <i>Salmonella</i>	35
2. La filière laitière face aux <i>Salmonella</i>	37
2.1. Situation en Europe et en France	37
2.2. Sérovars de <i>Salmonella</i> prédominants en Normandie	38
3. Contamination des laits crus par les <i>Salmonella</i>	39
3.1. Contamination du lait cru à la ferme	39
3.2. Colonisation et survie de <i>Salmonella</i> en milieu laitier	43
3.3. Prévention de <i>Salmonella</i> en filières au lait cru	46
3.3.1. <i>La prophylaxie sanitaire et autres méthodes préventives à la ferme</i>	46
3.3.2. <i>Mesures barrières lors de la transformation</i>	50
CHAPITRE III : La bioprotection	51
1. Généralités sur la bioprotection	51
2. Les bactéries lactiques en tant qu'agents bioprotecteurs	52
2.1. Généralités sur les bactéries lactiques	52
2.2. Activité anti- <i>Salmonella</i> des bactéries lactiques <i>in vitro</i>	53
2.3. Activité anti- <i>Salmonella</i> des bactéries lactiques en matrice laitière	54

3. Mécanismes d'action des bactéries lactiques.....	55
3.1. Composés inhibiteurs produits par les bactéries lactiques.....	57
3.1.1. <i>Les acides organiques</i>	57
3.1.2. <i>Le peroxyde d'hydrogène</i>	58
3.1.3. <i>Le diacétyl</i>	58
3.1.4. <i>La réutérine</i>	59
3.1.5. <i>Les bactériocines des bactéries lactiques</i>	59
3.2. Compétition pour les nutriments présents dans la matrice.....	62
4. Principaux micro-organismes impliqués et utilisés en industrie laitière.....	64
5. Critères essentiels à l'utilisation de micro-organismes bioprotecteurs en industrie alimentaire.....	68
5.1. Criblage des isolats.....	68
5.2. Innocuité des isolats.....	69
5.3. Réglementation.....	71
CHAPITRE IV : Objectifs de l'étude.....	73
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	79
CHAPITRE I : Matériels et méthodes.....	79
1. Souches et milieux de culture.....	80
1.1. Banque de souches utilisées.....	80
1.1.1. <i>Souches criblées provenant de l'environnement laitier</i>	80
1.1.2. <i>Souches de Salmonella testées</i>	82
1.2. Milieux et conditions de culture utilisés.....	83
2. Méthode de criblage par la production de composés.....	84
2.1. Démarche suivie.....	84
2.2. Mise au point de la méthode de criblage miniaturisée en milieu opaque.....	86
2.3. Application de la méthode.....	87
2.4. Etude de l'activité des surnageants.....	87
2.4.1. <i>Activité des surnageants en microplaque</i>	87
2.4.2. <i>Détection des acides organiques par HPLC</i>	90
3. Méthode de criblage par interaction en milieu liquide.....	91
3.1. Démarche suivie.....	91
3.2. Mise au point de la méthode de criblage en milieu liquide chimiquement défini.....	93
3.2.1. <i>Quantification des minéraux présents dans le lait cru et des besoins nutritionnels de Salmonella</i>	93
3.2.1.1. <i>Système BIOLOG GEN III MicroPlate™</i>	93
3.2.1.2. <i>Quantification d'éléments minéraux par ICP-MS</i>	94
3.2.2. <i>Transformation de souches de Salmonella avec le plasmide pBEN276</i>	95
3.2.2.1. <i>Plasmide pBEN276 : principe, extraction et quantification</i>	95
3.2.2.2. <i>Sélection et préparation de cellules de Salmonella électrocompétentes</i>	97
3.2.2.3. <i>Transformation des souches de Salmonella avec le plasmide pBEN276</i>	98
3.3. Validation et caractérisation des souches luminescentes.....	98
3.3.1. <i>Vérification de la transposition et lecture en temps réel</i>	98
3.3.2. <i>Stabilité du transposon</i>	99
3.3.3. <i>Suivi et corrélation de la densité optique et de la luminescence</i>	99
3.4. Application de la méthode de criblage.....	99
3.5. Mise en évidence de la levée d'inhibition par de potentiels facteurs de compétition en milieu chimiquement défini liquide.....	101
4. Tests permettant la validation et la sélection des candidats bioprotecteurs pour l'utilisation en transformation fromagère.....	101
4.1. Démarche suivie.....	101
4.2. Evaluation de la résistance aux antibiotiques.....	103

4.2.1.	<i>Milieux de culture</i>	103
4.2.2.	<i>Antibiotiques sélectionnés et méthodologie</i>	103
4.3.	Potentiel de production d'amines biogènes.....	105
4.3.1.	<i>Souches et milieux de culture</i>	105
4.3.2.	<i>Approche biochimique</i>	106
4.3.3.	<i>Approche moléculaire</i>	107
4.4.	Identification des micro-organismes retenus par séquençage de l'ADNr 16S.....	108
4.5.	Innocuité sur modèle <i>Galleria mellonella</i>	108
4.5.1.	<i>Elevage des larves</i>	109
4.5.2.	<i>Préparation des souches, injection et suivi de la mortalité des larves</i>	109
5.	Mise au point et sélection des associations des candidats bioprotecteurs	109
5.1.	Mise au point des conditions d'analyse.....	109
5.2.	Activité des associations sélectionnées en milieu chimiquement défini lait sur <i>Salmonella</i> Mbandaka UCMA 20269 ^{lux+}	110
5.3.	Activité d'associations ternaires en matrice laitière et confrontation avec des souches de <i>Salmonella</i> de terrain.....	110
6.	Vérification de la non-inhibition des ferments et de leurs activités par les souches sélectionnées	111
6.1.	Ferments utilisés par les fromageries dans cette étude.....	111
6.2.	Impact sur l'acidification en milieu lait et croissance des bactéries d'affinage et des flores de bioprotection.....	112
7.	Validation des associations en fromage	113
7.1.	Validation des activités anti- <i>Salmonella</i> des associations en matrice laitière et fromagère en laboratoire.....	113
7.1.1.	<i>Etude de l'activité anti-Salmonella en lait mûré</i>	114
7.1.2.	<i>Etude de l'activité anti-Salmonella sur caillé</i>	114
7.1.3.	<i>Etude de l'activité anti-Salmonella en mini Camembert en laboratoire</i>	114
7.2.	Préparation et contrôle qualité des associations bioprotectrices utilisées pour les fabrications pilotes.....	115
7.2.1.	<i>Milieux de culture</i>	115
7.2.2.	<i>Méthodologie</i>	116
7.3.	Analyses des fabrications fromagères.....	117
7.3.1.	<i>Analyses microbiologiques</i>	117
7.3.2.	<i>Suivi pH, extrait sec et protéolyse</i>	119
7.4.	Evaluation de l'impact des associations sur les qualités organoleptiques des Camemberts au lait cru mécanisé.....	119
8.	Schéma récapitulatif de la méthodologie globale de cette étude	119
CHAPITRE II : Résultats et discussion		125
1.	Méthode de criblage par amensalisme et/ou antibiose	125
1.1.	Validation de la méthode de criblage par amensalisme et/ou antibiose.....	125
1.2.	Criblage de candidats bioprotecteurs.....	127
1.3.	Sélection d'isolats inhibiteurs par amensalisme et/ou antibiose.....	135
1.4.	Criblage sur les souches de <i>Salmonella</i> de terrain.....	137
2.	Criblage par action de type interaction nutritionnelle	140
2.1.	Recherche des nutriments potentiellement enjeux de compétition.....	140
2.1.1.	<i>Mise en évidence des capacités nutritionnelles de Salmonella par le système BIOLOG GEN III MicroPlate™</i>	140
2.1.2.	<i>Mise en évidence des minéraux présents dans le lait par analyse ICP-MS</i>	143
2.2.	Validation de la méthodologie de criblage.....	146
2.2.1.	<i>Impact de la transformation sur la croissance des souches</i>	147
2.2.2.	<i>Vérification de la stabilité du transposon et validation de l'effet temps réel du signal</i>	148
2.2.3.	<i>Validation des conditions d'analyse</i>	149

2.2.4.	<i>Corrélation entre croissance et luminescence</i>	151
2.2.5.	<i>Comparaison entre vitesse de croissance et luminescence</i>	152
2.3.	Criblage en milieu liquide chimiquement défini.....	158
2.3.1.	<i>Criblage en milieu lait chimiquement défini</i>	158
2.3.2.	<i>Criblage en milieu fromage chimiquement défini</i>	159
2.3.3.	<i>Bilan des souches actives</i>	160
3.	Mise en évidence des mécanismes mis en jeu par les souches sélectionnées	160
3.1.	Nature des molécules produites	160
3.1.1.	<i>Activité des surnageants en microplaque</i>	160
3.1.2.	<i>Détection des acides organiques par HPLC</i>	162
3.2.	Recherche de nutriments potentiellement impliqués dans une interaction nutritionnelle.....	166
3.2.1.	<i>Milieu lait chimiquement défini</i>	167
3.2.2.	<i>Milieu fromage chimiquement défini</i>	168
4.	Sélection des candidats pour l'utilisation en transformation fromagère	170
4.1.	Evaluation de la résistance à divers antibiotiques.....	170
4.2.	Potentiel de production d'amines biogènes	173
4.3.	Innocuité sur modèle larves de <i>Galleria mellonella</i>	175
4.4.	Comportement des ferments fromagers en présence des candidats bioprotecteurs	176
4.4.1.	<i>Croissance des bactéries d'affinage et des flores bioprotectrices utilisées en fromagerie en présence des candidats bioprotecteurs</i>	176
4.4.2.	<i>Suivis d'acidification en lait reconstitué</i>	177
4.5.	Isolats sélectionnés.....	177
5.	Associations des candidats bioprotecteurs sélectionnés	179
5.1.	Activités des associations binaires en milieu chimiquement défini lait.....	181
5.2.	Activités des associations ternaires en milieu chimiquement défini lait	182
5.3.	Bilan des associations sélectionnées en milieu chimiquement défini lait.....	183
5.4.	Activités des associations en lait confrontées à des <i>Salmonella</i> de terrain.....	184
6.	Impact des flores bioprotectrices sur <i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.859 en matrice fromagère	186
6.1.	Inoculation dans du lait	186
6.2.	Inoculation sur du caillé.....	188
6.3.	Fabrication de mini fromages	189
7.	Impact sur la fabrication du Camembert au lait cru mécanisé	191
7.1.	Impact sur les caractéristiques physico-chimiques : pH, extrait sec et protéolyse	191
7.2.	Impact sur les différentes flores	192
7.2.1.	<i>Suivi des bactéries à Gram négatif</i>	192
7.2.2.	<i>Suivi des bactéries lactiques</i>	193
7.2.3.	<i>Suivi de la flore fongique</i>	194
7.2.4.	<i>Suivi des bactéries d'affinage</i>	195
7.2.5.	<i>Impact sur les qualités organoleptiques</i>	196
	CHAPITRE III : Discussion générale	201
	Conclusion et perspectives	215
	REFERENCES	223
	ANNEXES	256
	TROISIEME PARTIE : VALORISATION SCIENTIFIQUE	270

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- ALOA** : Gélose Listeria selon Ottaviani et Agosti
- ARN** : Acide Ribonucléique
- AOC** : Appellation d'Origine Contrôlée
- AOP** : Appellation Origine Protégée
- BHI** : Brain Heart Infusion
- BP + RPF** : Baird-Parker plus plasma de lapin et fibrinogène
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CONOBIAL** : CONservatoire NORmand de la micro-BIodiversité ALimentaire
- CRBM** : Cheese Ripening Bacteria Medium
- DO** : Densité Optique
- FAM** : Flore Aérobie Mésophile
- FDA** : Food Drug Administration
- GRAS** : Generally Recognized as Safe
- HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- LAB** : Lactic Acid Bacteria
- MRSi** : Gélose de Man, Rogosa, Sharpe inhibitor
- NSLAB** : Non Starter Lactic Acid Bacteria
- OGYE** : Gélose à l'Oxytétracycline, au Glucose et à l'extrait de levure
- PCAi** : Plate Count Agar inhibitor
- PCR** : Polymerase chain reaction
- QPS** : Qualified Presumption of Safety
- RPM** : Rotation Par Minute
- SOC** : Super Optimal broth (with Catabolite repression)
- T°C** : Température en degrés Celsius
- TSA-YE** : Tryptone Soya Agar Yeast Extract
- UCMA** : Université de Caen Microbiologie Alimentaire
- UFC** : Unité Formant Colonie
- UV** : Ultra-Violet
- VRBG** : Gélose glucosée biliée au cristal violet et rouge neutre
- XLD** : Gélose Xylose Lysine Désoxycholat

Table des illustrations – Tableaux

Tableau 1 : Composition moyenne des principaux constituants du lait de vache entier (Jeantet and Croguennec, 2018).....	5
Tableau 2 : Nature et répartition des composés lipidiques dans le lait de vache (adapté de Park and Haenlein, 2013).....	6
Tableau 3 : Composition moyenne des protéines du lait de vache (Jeantet and Croguennec, 2018) ..	7
Tableau 4 : Composition moyenne de l'azote non protéique du lait de vache (Jenness, 1974).....	8
Tableau 5 : Concentration en nucléotides 5' monophosphates dans le lait (Gill and Indyk, 2007a)....	9
Tableau 6 : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (FAO, 1998)	9
Tableau 7 : Teneur en oligo-éléments présents dans le lait (Renner, 1983; Renner et al., 1989).....	10
Tableau 8 : Teneur moyenne en vitamines dans le lait (Courtet Leymarios, 2010)	11
Tableau 9 : Richesse bactérienne et fongique, en nombre d'espèces, rencontrée dans les laits crus (Montel et al., 2014)*	13
Tableau 10 : Niveaux de population des principaux groupes microbiens du lait cru de vache (d'après Montel et al., 2014).....	14
Tableau 11 : Principaux genres ou espèces de bactéries à Gram négatifs des laits crus et possibles sources environnementales (Montel et al., 2014)	17
Tableau 12 : Genres et espèces de bactéries à Gram négatifs retrouvés à la surface du livarot (Cogan et al., 2014)	18
Tableau 13 : Composition nutritionnelle du Camembert au lait cru (source : CIQUAL 2008)	23
Tableau 14 : Classification du genre <i>Salmonella</i>	33
Tableau 15 : Récapitulatif représentant le nombre de sérovars en fonction des espèces et sous-espèces de <i>Salmonella</i> (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).....	34
Tableau 16 : Principaux caractères biochimiques permettant d'identifier le genre <i>Salmonella</i> (Humbert et al., 1998).....	35
Tableau 17 : Répartition de quelques sérovars de <i>Salmonella</i> retrouvés dans quatre régions de France éloignées (adapté de Anses, 2017).....	39
Tableau 18 : Différents temps de survie de <i>Salmonella</i> dans plusieurs milieux (Camart-Périer, 2006)	41
Tableau 19 : Métabolisme du carbone et de l'azote de diverses souches de sérovars différents chez <i>Salmonella enterica</i> . Les sources retenues sont présentes dans le lait, ou les produits laitiers fermentés et non fermentés (Schlusselhuber et al, submitted).....	45
Tableau 20 : Utilisation de probiotiques à la ferme et effets observés face à <i>Salmonella</i> (d'après Poupée, 2016)	49
Tableau 21 : Classification de la famille des bactéries lactiques (Liu et al., 2014; Zheng et al., 2020)	52
Tableau 22 : Liste non exhaustive de bactéries lactiques inhibitrices de <i>Salmonella in vitro</i>	53
Tableau 23 : Exemples de communautés microbiennes inhibitrices de <i>Salmonella</i> en matrice laitière (Schlusselhuber et al, to be submitted)	55

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Tableau 24 : Activité des principales bactériocines produites par des bactéries lactiques.....	62
Tableau 25 : Différentes espèces de lactobacilles possédant une activité antifongique sur milieu gélosé ou dans leur surnageant de culture en milieu MRS (Rouxel, 2019).....	65
Tableau 26: Liste des principaux ferments bioprotecteurs commercialisés pour des applications laitières.....	67
Tableau 27 : Liste des différentes souches et sérovars de <i>Salmonella</i> utilisés ainsi que leur origine.....	83
Tableau 28 : Composition des milieux chimiquement définis lait et fromage	88
Tableau 29 : Liste des souches utilisées pour la caractérisation du profil de <i>Salmonella enterica</i> par GEN III	94
Tableau 30 : Eléments quantifiables par ICP-MS via la plateforme PLATIN’	95
Tableau 31 : Liste des antibiotiques testés en fonction du genre bactérien	104
Tableau 32 : Liste des différents breakpoints retenus pour chaque antibiotique utilisé en fonction du genre bactérien.....	105
Tableau 33 : Composition du milieu de culture mettant en évidence le potentiel de production des amines biogènes (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).....	107
Tableau 34 : Set de primers utilisées pour la détection des gènes d’amines biogènes par PCR multiplex	107
Tableau 35 : Liste et composition des différents ferments testés dans le cadre de cette étude	112
Tableau 36 : Milieux de cultures utilisés pour le suivi des contrôles qualité des cultures bioprotectrices.....	115
Tableau 37 : Milieux et conditions de culture utilisés pour le dénombrement des différents micro-organismes	118
Tableau 38 : Répartition des différentes analyses effectuées au cours du suivi des fabrications....	119
Tableau 39 : Isolats actifs contre trois souches de <i>Salmonella</i> en milieu BHI	130
Tableau 40 : Isolats actifs contre trois souches de <i>Salmonella</i> en milieu « lait ».....	132
Tableau 41 : Isolats actifs contre trois souches de <i>Salmonella</i> en milieu « fromage ».....	134
Tableau 42 : Sélection des 49 isolats en fonction de leurs activités sur les différents milieux et souches de <i>Salmonella</i>	136
Tableau 43 : Bilan des souches sélectionnées sur le criblage par amensalisme et/ou antibiose.....	139
Tableau 44 : Profil des isolats de <i>Salmonella</i> testés à l’aide des plaques BIOLOG GEN III	142
Tableau 45 : Quantification de différents éléments chimiques dans trois laits par analyse en ICP-MS (n = 1).....	144
Tableau 46 : Pourcentage par analyse ICP-MS des différents éléments chimiques captés dans le surnageant de culture de <i>Salmonella</i> UCMA 19909 et UCMA 12999 après culture en lait écrémé reconstitué	146
Tableau 47 : Répartition par genre des isolats actifs en milieu chimiquement défini lait.....	159
Tableau 48 : Représentation du genre des isolats actifs en milieu chimiquement défini fromage..	159
Tableau 49 : Bilan des souches actives avec la méthode en milieu chimiquement défini liquide ..	160
Tableau 50 : Levées d’inhibition de <i>Salmonella</i> Mbandaka UCMA 20269 ^{lux+} en milieu lait chimiquement défini modifié par la supplémentation en divers nutriments.....	168

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Tableau 51 : Levées d'inhibition de <i>Salmonella</i> Mbandaka UCMA 20269 ^{lux+} en milieu chimiquement défini fromage modifié	169
Tableau 52 : Résistance aux antibiotiques observées des candidats bioprotecteurs	172
Tableau 53 : Evaluation de la mortalité de larves de <i>Galleria mellonella</i>	175
Tableau 54: Index de score représentant la santé d'une larve <i>Galleria mellonella</i> (Loh et al., 2013)	176
Tableau 55 : Liste des isolats sélectionnés pour la création d'associations et mécanismes d'action	178
Tableau 56 : Représentation de l'inhibition de la croissance de <i>S. Mbandaka</i> UCMA 20269 ^{lux+} en présence des isolats sélectionnés en milieu chimiquement défini lait	180
Tableau 57 : Isolats testés en associations binaires	181
Tableau 58 : Sélection des associations de candidats bioprotecteurs	183
Tableau 59 : Représentation de l'évolution de l'extrait sec (%) au cours de l'affinage.....	192
Tableau 60 : Représentation de l'évolution de la protéolyse au cours de l'affinage	192
Tableau 61 : Analyse sensorielle des fromages en présence ou non des associations après 35 et 65 jours d'affinage	197

Table des illustrations – Figures

Figure 1 : Aire géographique du Camembert de Normandie (Source : BDCARTO-IGN, INAO, AOUT 2010).....	22
Figure 2 : Processus de fabrication du Camembert de Normandie (d’après le cahier des charges n° 2008-984).....	24
Figure 3 : Schéma représentant la succession des différentes bactéries et champignons au cours du processus du transformation du fromage (Institut de l’élevage, 2016).....	26
Figure 4 : Distribution et fréquences des agents pathogènes associés à des TIAC liées à la consommation de lait et produits laitiers (Figure adaptée de EFSA 2019)	31
Figure 5: Répartition des sérovars isolés (en nombre de souches) dans les produits laitiers en 2017 en France (d’après ANSES, 2017).....	38
Figure 6 : Diffusion de <i>Salmonella</i> sp. à la ferme (adapté de Schlusshuber et al, submitted).....	40
Figure 7 : Principaux mécanismes d’action des microorganismes d’après (Montesinos and Bonaterra, 2009)	56
Figure 8 : Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques (Agriopoulou et al., 2020)	57
Figure 9 : Les différentes classes de bactériocines ainsi que de leurs mécanismes d’action (Taale et al., 2016)	59
Figure 10 : Représentation des interactions de <i>Salmonella</i> dans l’environnement laitier dans le cas d’une approche par la bioprotection	72
Figure 11 : Démarche générale de cette étude	75
Figure 12 : Représentation générale de la démarche méthodologique pour l’étude d’agents anti- <i>Salmonella</i> en contexte laitier et fromager	79
Figure 13 : Répartition des 1 450 isolats utilisés pour l’étude en fonction de leur genre présumé ...	81
Figure 14 : Représentation de la démarche suivie pour la mise au point d’une méthodologie permettant la mise en évidence de compétition par amensalisme et/ou antibiose en milieux opaque.....	85
Figure 15 : Représentation de la démarche suivie pour la mise au point d’une méthodologie permettant la mise en évidence de compétition en milieux liquides	92
Figure 16: Représentation schématique du plasmide pBEN276 (d’après https://www.addgene.org/69150/)	96
Figure 17 : Répartition des genres présumés des 414 souches utilisées pour le criblage en milieu liquide chimiquement défini	100
Figure 18 : Représentation générale de la démarche suivie pour la sélection des associations finales	102
Figure 19 : Procédé de fabrication du Camembert au lait cru mécanisé	117
Figure 20 : Schéma récapitulatif de la méthodologie globale.....	121
Figure 21 : Evaluation de l’inhibition de trois isolats contre <i>Salmonella</i> Newport CIP 105.629 en milieu BHI	126
Figure 22 : Répartition des isolats actifs en fonction de leur genre.....	128

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 23 : Répartition en pourcentage des isolats actifs contre les différents sérovars de <i>Salmonella</i> en milieu gélosé BHI	129
Figure 24 : Répartition en pourcentage des isolats actifs contre les différents sérovars de <i>Salmonella</i> en milieu gélosé « lait »	131
Figure 25 : Répartition en pourcentage des isolats actifs contre les différents sérovars de <i>Salmonella</i> en milieu « fromage »	133
Figure 26 : Représentation de l'activité des isolats contre les 26 souches de <i>Salmonella</i> testées en	137
Figure 27 : Représentation de l'activité des isolats contre les 29 souches de <i>Salmonella</i> testées en milieu « fromage »	138
Figure 28 : Courbe de croissance des deux souches transformées UCMA 20268 ^{lux+} et UCMA 20269 ^{lux+} et non transformées UCMA 19909 et UCMA 12999 en milieu LB à 37°C	147
Figure 29 : Evaluation de la transposition et mesure en temps réel de la luminescence sur les deux souches transformées en milieu LB	148
Figure 30 : Evaluation de la stabilité du transposon chez les deux souches de <i>Salmonella</i> transformées au cours du temps en milieu LB.....	149
Figure 31 : Comparaison de la croissance des souches transformées en milieux chimiquement définis VS un milieu riche LB	150
Figure 32 : Corrélation entre luminescence et densité optique des souches transformées et non transformées en milieu LB à 37 °C.....	152
Figure 33 : Représentation du suivi de DO et de luminescence pour la souche <i>S. Typhimurium</i> UCMA 20268 ^{lux+} en milieu chimiquement défini lait	153
Figure 34 : Corrélation entre vitesse de croissance et de luminescence pour la souche <i>S. Typhimurium</i> UCMA 20268 ^{lux+} sur 24 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait	154
Figure 35 : Corrélation entre vitesse de croissance et de luminescence pour la souche <i>S. Typhimurium</i> UCMA 20268 ^{lux+} entre 2 et 7,5 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait	155
Figure 36 : Représentation du suivi de DO et de luminescence pour la souche <i>S. Mbandaka</i> UCMA 20269 ^{lux+} en milieu chimiquement défini lait.....	156
Figure 37 : Corrélation entre vitesse de croissance de luminescence pour la souche <i>S. Typhimurium</i> UCMA 20268 ^{lux+} sur 24 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait	157
Figure 38 : Corrélation entre vitesse de croissance de luminescence pour la souche <i>S. Mbandaka</i> UCMA 20269 ^{lux+} entre 8 et 24 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait	157
Figure 39 : Pourcentage d'inhibition de la croissance de <i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.851 par les surnageants des souches cultivées en milieu lait chimiquement défini	161
Figure 40 : Représentation de la production d'acide lactique et acétique des surnageants en milieu chimiquement défini lait	163
Figure 41 : Représentation des autres pics observés par HPLC dans les surnageants obtenus en milieu chimiquement défini lait.....	164
Figure 42 : Valeurs de pH des isolats en milieu chimiquement défini lait.....	165
Figure 43 : Détection de la présence du gène de l'agmatine déiminase par méthode PCR.....	174

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 44 : Activité acidifiante en demi-écrémé de ferments en présence ou non de la souche UCMA 5972	177
Figure 45 : Cinétique de croissance de <i>Salmonella</i> Mbandaka UCMA 20269 ^{lux+} en co-culture avec des associations de trois isolats en milieu chimiquement défini lait	182
Figure 46 : Evaluation de l'inhibition des 5 souches de <i>Salmonella</i> en lait en présence des associations bioprotectrices sélectionnées	186
Figure 47 : Evaluation de l'inhibition de <i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.859 en lait en présence des associations bioprotectrices	187
Figure 48 : Evolution de la concentration de <i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.859 sur caillé de Camembert en présence des associations bioprotectrices.....	188
Figure 49 : Evaluation de l'inhibition de <i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.859 lors de fabrications de mini fromages en présence des associations bioprotectrices	190
Figure 50 : Représentation de l'évolution du pH au cours de la transformation fromagère.....	191
Figure 51 : Représentation de l'évolution des bactéries à Gram négatif au cours du processus de transformation fromagère	193
Figure 52 : Représentation de l'évolution des bactéries lactiques au cours du processus de transformation fromagère	194
Figure 53 : Représentation de l'évolution de la flore fongique au cours du processus de transformation fromagère	195
Figure 54 : Représentation de l'évolution des bactéries d'affinage au cours du processus de transformation fromagère	196
Figure 55 : Représentation générale des résultats de cette étude.....	217

PREAMBULE

La Normandie est connue pour ses fromages emblématiques : Camembert de Normandie, Pont-L'Évêque, Livarot et Neufchâtel qui bénéficient d'une Appellation d'Origine Protégée (AOP), signe de qualité reconnu par les pouvoirs publics. Chaque année, plus de 10 500 tonnes de ces fromages sont vendues. Actuellement, le cahier des charges AOP impose l'utilisation de lait cru pour la fabrication du Camembert de Normandie. Bien que ce ne soit pas exclusivement le cas pour les trois autres fromages, ils peuvent cependant être produits à partir de lait cru. Au total 75 % des fromages AOP de Normandie sont produits au lait cru, et donc plus sensibles au risque de présence de bactéries pathogènes. Pour des raisons sanitaires, chaque année, seulement 36% du lait collecté est réellement mis en œuvre pour la fabrication de fromages au lait cru et plus de 10% des fromages doivent être détruits, représentant un lourd préjudice pour les laiteries et les producteurs. Parmi les micro-organismes potentiellement pathogènes susceptibles d'être présents dans ces types de produits *Salmonella enterica* est retrouvée.

Afin de limiter le risque de contamination par *Salmonella*, plusieurs projets ont vu le jour en partenariat avec la filière AOP. Un projet dédié à la maîtrise de la salmonellose en élevage bovin laitier, porté par le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) de l'Orne, est en cours et évalue l'impact de mesures de gestion sanitaire associées à une vaccination répétée et à l'ajout de pré- et probiotiques dans la ration. Cependant, les actions étudiées sont parfois difficiles à mettre en place par les producteurs de lait et ne réduisent pas suffisamment les contaminations à *Salmonella* de l'environnement laitier. C'est donc dans l'optique d'apporter des solutions complémentaires en aval que le projet CESam (Conception et Évaluation de bio-barrières multiples pour la maîtrise de bactéries potentiellement pathogènes dans la filière fromagère AOP au lait cru de Normandie : application aux *Salmonella*) a vu le jour en 2017. Ce projet a été labellisé par le pôle de compétitivité Valorial, et a bénéficié d'un financement FEDER et Région Normandie.

Il s'insère dans les thématiques du groupement d'intérêt scientifique AOP laitières de Normandie (GALAN), créé en 2015, associant la filière laitière AOP normande (L'association de gestion des ODG laitiers Normands ainsi que l'Union des Producteurs de lait en AOP) et l'Université de Caen Normandie. L'objectif de GALAN est de fournir des éléments scientifiques et techniques pour assurer collectivement l'existence, le développement et la pérennité des fromages AOP normands.

Le projet CESam avait pour objectifs d'étudier et de sélectionner divers micro-organismes pour permettre, par la bioprotection, de contribuer à sécuriser les productions AOP. Le premier volet était axé sur la recherche de bactériophages inhibiteurs de *Salmonella* et le second volet sur la sélection de bactéries et levures anti-*Salmonella*.

Cette thèse CIFRE s'est réalisée dans le cadre du projet CESam en se focalisant sur le second axe de recherche de bactéries et levures à activité anti-*Salmonella* pour l'application en transformation fromagère. Les travaux ont été réalisés au sein de l'entreprise porteuse du projet pour le compte de la filière, la fromagerie GILLOT, et de l'E.A 4651 (Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements) dans l'équipe MALIM (Matrices Alimentaires et Microbiotes) à l'Université de Caen Normandie. Les thématiques de l'équipe MALIM, membre du RMT Florepro et du RMT Filières fromagères valorisant leurs terroirs, visent à :

- Comprendre la construction et le fonctionnement des communautés microbiennes (bactéries, levures et moisissures, phages) des aliments fermentés ou non
- Caractériser les propriétés technologiques, bioprotectrices et probiotiques de microorganismes et communautés d'intérêt alimentaire
- Valoriser ces microorganismes pour l'élaboration de nouveaux ferments (ferments du futur)
- Définir des marqueurs de qualité et/ou d'authenticité des aliments.

Ce mémoire s'articule autour de trois grandes parties. La **première partie**, divisée en quatre chapitres, fait l'état de l'art sur le sujet :

- Les caractéristiques des laits crus et la transformation fromagère (Chapitre 1)
- Les *Salmonella* en environnement laitier (Chapitre 2)
- La bioprotection (Chapitre 3)
- Les objectifs de l'étude (Chapitre 4)

La **seconde partie** contient quatre chapitres décrivant les travaux menés au cours de cette thèse : les matériels et méthodes utilisés (Chapitre 1), les résultats et discussion (Chapitre 2), la discussion générale (Chapitre 3) puis la conclusion générale et les perspectives de ce travail (Chapitre 4).

Pour finir, la **troisième partie** présente les productions scientifiques issues des travaux menés dans le cadre de cette thèse.

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

1. La matrice lait cru

Le règlement (CE) n°853/2004 définit le lait cru comme le lait produit par la sécrétion de la glande mammaire d'animaux d'élevage et non chauffé à plus de 40°C, ni soumis à un traitement d'effet équivalent.

1.1. Caractéristiques physico-chimiques

Le lait cru est une matrice complexe, constituée en grande majorité d'eau (environ 90%). Son pH est compris entre 6,6 et 6,8 et sa densité entre 1,030 et 1,034. Il est constitué de ce que l'on nomme une solution vraie, qui regroupe les protéines solubles, les minéraux, les vitamines et les sucres, et d'une solution colloïdale, comprenant les protéines non solubles que sont les caséines. Les concentrations de ces différents composants sont dépendantes de très nombreux facteurs dont l'espèce animale, la race, l'alimentation mais aussi l'environnement ou encore la saison. Le tableau 1 présente la composition moyenne des principaux constituants du lait (Jeantet and Croguennec, 2018).

Tableau 1 : Composition moyenne des principaux constituants du lait de vache entier (Jeantet and Croguennec, 2018)

Constituant	Teneur en % (masse/volume)
Lactose	4,6-5,0
Matières grasses	3,5-4,0
Minéraux	0,7-0,9
Protéines	3,0-3,5

Le sucre majoritaire dans le lait est le lactose. Il est présent à hauteur de 48 g/L en moyenne, et représente le seul sucre libre dans cette matrice. Son hydrolyse sous l'action de la β -galactosidase (ou de la phospho- β -galactosidase) libère du glucose et du galactose (ou du galactose-6-phosphate).

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

1.1.1. Les lipides

La matrice laitière est composée de matière grasse (de 3,5 à 4%), et notamment de lipides retrouvés sous forme de globules gras. Le tableau 2 regroupe les grandes classes des différents constituants lipidiques du lait de vache, ainsi que leurs proportions. Ceux-ci sont présents à hauteur de 4% dans le lait (Renner, 1983). Parmi ces lipides, les simples et les complexes sont retrouvés.

Les lipides simples regroupent majoritairement les glycérides, principaux lipides de la matière grasse, dont les triglycérides retrouvés majoritairement au cœur des globules gras suivis des di- et mono-glycérides. Dans le lait de vache la teneur en acides gras polyinsaturés est faible avec une concentration de 5% (Guetouache et al., 2014).

Les lipides complexes, eux, sont représentés en majorité par les phospholipides (céphalines, lécithines, et sphingomyélines) même si, à l'échelle du lait, ils ne représentent qu'environ 1% des lipides de la matière grasse. Ils jouent le rôle de constituants du globule gras (au niveau de la membrane lipoprotéique du globule gras) et de stabilisant de l'émulsion. Leurs caractéristiques, à la fois lipo-et hydrophiles, leur permettent de former des ponts entre phases grasse et aqueuse.

Parmi les stérols, le cholestérol est le constituant majeur. Ces stérols entrent dans la composition de la membrane lipoprotéique du globule gras et contribuent à la stabilité de l'émulsion.

Tableau 2 : Nature et répartition des composés lipidiques dans le lait de vache (adapté de Park and Haenlein, 2013)

Composé lipidique	Pourcentage dans la matière grasse totale
Triglycérides	98,3
Diglycérides	0,3
Monoglycérides	0,03
Acides gras libres	0,1
Phospholipides	0,8
Lipides non saponifiables	1,5
Stérols	0,5

1.1.2. Les protéines

Dans le lait, les protéines représentent en moyenne 3,5% de la matrice et peuvent être classées en deux catégories : les caséines, environ 80% des protéines totales (Bordin et al., 2001) et les protéines du lactosérum, entre 17 et 20% des protéines, (Wang Lu et al., 2008). Le tableau 3 ci-dessous représente la composition moyenne des protéines du lait.

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

Tableau 3 : Composition moyenne des protéines du lait de vache (Jeantet and Croguennec, 2018)

Protéine	Concentration (g/L)
Caséine α	12,6
Caséine β	9,3
Caséine κ	3,3
Caséine γ	0,8
α -Lactalbumine	1,2
β -Lactoglobuline	3,2
Sérum albumine bovine	0,4
Immunoglobulines	0,8
Protéoses peptones	0,8
Lactoferrine	0,1
Transferrine	0,1
Protéines membranaires des globules gras	0,4

Les caséines sont réparties en 4 catégories : α , β , κ et γ . Les caséines α et β représentent à elles seules 50 et 45% respectivement des caséines du lait de vache (Farrell et al., 2004). Parmi les caséines α il existe deux sous-catégories : les caséines α_{S1} , représentant 40% des caséines totales présentes dans le lait, et les α_{S2} représentant 10% des caséines totales. Les caséines κ et γ sont présentes à des concentrations de 12 et 3% respectivement.

Les protéines du lactosérum elles, sont divisées en deux grandes catégories : l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline, représentant 80% des protéines totales du lactosérum (Csapó and Csapón, 2002, 2009). La α -lactalbumine est présente à des concentrations comprises entre 0,98 et 1,25 g/L. La β -lactoglobuline, elle, varie entre 2,93 et 5,5 g/L dans le lait.

D'autres protéines sont également présentes telles que les immunoglobulines, la lactoferrine, les protéoses peptones, la sérumalbumine (Park et al., 2007). Certaines de ces protéines ont des rôles importants notamment au niveau des fonctions biologiques (Fox et al., 1998). Parmi ces protéines, la lactoferrine est bien connue pour son pouvoir de captation du fer, empêchant les bactéries de l'assimiler. Sa concentration dans le lait est néanmoins faible, entre 2 et 20 g/L (Park et al., 2007), et peut varier en fonction de la saison ou encore de la race de l'animal. La sérumalbumine bovine, ou BSA, a été trouvée à hauteur de 0,4 g/L dans le lait de vache (Walstra and Jenness, 1984). Dans cette même étude, la concentration en immunoglobulines a été évaluée jusqu'à 0,7 g/L. Parmi ces immunoglobulines ce sont les IgG que l'on va retrouver de manière prédominante (80-90%) puis

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

ensuite les IgM (7%) et IgA (5%) (Renner et al., 1989).

Des enzymes tel que le lysozyme sont également présentes dans le lait à une concentration comprise entre 0,1 et 0,35 µg/L (Rodrigues, 2013). C'est un antimicrobien majoritaire dans la matrice, tout comme la lactoperoxydase (Mullan, 2003) qui est l'enzyme la plus abondante dans le lait cru (Korhonen, 2009).

1.1.3. Les matières azotées non protéiques

L'ensemble des matières azotées non protéiques du lait de vache sont présentées dans le tableau 4 (Jenness, 1974). Cette fraction ne représente qu'un faible pourcentage de l'azote présent dans le lait et des variations des concentrations sont observées, notamment pour l'urée, lors du changement de saison et de nourriture dans le troupeau (Vignon et al., 1978).

Tableau 4 : Composition moyenne de l'azote non protéique du lait de vache (Jenness, 1974)

Substances azotées	Concentration (g/L)
Urée	0,18
Créatine	0,04
Acide urique	0,023
Ammoniac	0,007
Taurine	0,05
Carnitine (libre et acylée)	0,01
Acide orotique	0,067
Acide N-acétyl-neuraminique	0,150
Dérivés glucidiques	0,26
Dérivés phospholipidiques	0,07

Plusieurs études ont évalué la concentration en nucléotides du lait de vache selon différentes méthodologies. Le tableau 5 ci-dessous, adapté de Gill et Indyk (2007), répertorie les résultats de différentes études réalisées sur du lait. D'après cette synthèse, il semblerait que la mise en évidence de ces nucléotides dépende de la technique utilisée et qu'ils soient difficilement détectables.

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

Tableau 5 : Concentration en nucléotides 5' monophosphates dans le lait (Gill and Indyk, 2007a)

Adenosine 5'- monophosphate	Cytidine 5'- monophosphate	Guanosine 5'- monophosphate	Inosine 5'- monophosphate	Uridine 5'- monophosphate	Référence
nd ^a	0,9	nd	- ^b	nd	(Johke, 1963)
nd – 0,4	0,9 – 2,7	nd	-	nd	(Kobata, 1963)
1,8 – 2,9	1,2 – 4,9	nd	-	nd	(Gil and Sanchez-
2,0 – 2,8	1,9 – 3,3	nd	-	nd	Medina, 1981)
-	0,3	0,2	-	-	(Johke and Goto, 1962)
Trace	3,0	nd	nd	nd	(Ferreira et al., 2001)
0,1	1,0	nd	0	0,1	(Sugawara et al., 1995)
nd	0,2 – 0,3	nd	nd	nd	(Gill and Indyk, 2007b)

a : not detected

b : not reported

1.1.4. Les minéraux, oligo-éléments et vitamines

Les minéraux sont présents dans le lait à une concentration d'environ 7 g/L. Ils sont répartis soit dans la fraction soluble, soit dans la fraction insoluble (forme liée). Ils sont, dans le lait, les éléments les mieux absorbés et représentent donc un enjeu majeur pour la croissance de nombreux micro-organismes de par leur disponibilité. Le tableau 6 représente les constituants majeurs présents dans le lait de vache. Des sels tels que le citrate de sodium (1,8 g/L) sont également retrouvés.

Tableau 6 : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (FAO, 1998)

Composés	Teneurs moyennes (g/L)
Citrate de sodium	1,80
Calcium	1,25
Chlore	1
Magnésium	0,12
Phosphore	0,95
Potassium	1,50
Sodium	0,50
Soufre	0,35

Le chlore, le potassium et le sodium sont retrouvés uniquement sous leur forme d'ions ce qui permet une forte biodisponibilité. D'autres composants, comme le calcium et le magnésium, peuvent être retrouvés dans les deux fractions. Le calcium et magnésium sont retrouvés sous forme d'ions dans la fraction soluble (forme saline, non dissociée ou complexe) et associés aux micelles de caséines dans la fraction insoluble. Pour le calcium, plus de la moitié (65%) se trouve sous forme insoluble au

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

sein des micelles de caséines. Il est présent sous la forme de phosphate, de phosphocasinatate et de citrate de calcium. Environ 70% du magnésium est retrouvé en solution, le restant est lié aux caséines. Quant au phosphore, il est majoritairement présent sous forme inorganique et le restant est retrouvé au niveau des phospholipides et des esters. Des formes liées aux caséines via les acides aminés sérine et thréonine sont aussi retrouvées.

Les oligo-éléments sont présents dans le lait à de très faibles concentrations et majoritairement sous forme organique. Lorsque les concentrations sont plus élevées, ils sont retrouvés sous la forme inorganique (peu de biodisponibilité), ce qui est le cas pour le manganèse et le cuivre qui sont liés aux caséines via les phosphates. Le tableau 7 représente les concentrations des différents oligoéléments présents dans le lait (Renner, 1983; Renner et al., 1989).

Tableau 7 : Teneur en oligo-éléments présents dans le lait (Renner, 1983; Renner et al., 1989)

Oligo-éléments	Teneurs (µg/L)
Aluminium	600-1 000
Brome	150
Cobalt	0,5
Cuivre	20-40
Fer	200-500
Fluor	70-200
Iode	10-300
Manganèse	10-30
Sélénium	10-30
Zinc	3 000-6 000

Certains, comme le sélénium, l'iode, le fluor et le brome, sont présents à des concentrations pouvant varier d'un troupeau à un autre et également entre régions. Cela s'explique par les différences de concentrations de ces éléments dans le sol (Courtet Leymarios, 2010).

Le lait contient une variété importante de vitamines puisque les 13 connues à ce jour y sont retrouvées. L'utilisation du lait cru permet de préserver cette diversité puisque les traitements du lait peuvent altérer ce taux déjà faible dans la matrice, notamment pour la vitamine C (Gregory, 1975). Le tableau 8 liste les vitamines présentes dans le lait ainsi que leurs concentrations. Elles peuvent être classées en deux catégories : les hydrosolubles et les liposolubles.

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

Tableau 8 : Teneur moyenne en vitamines dans le lait (Courtet Leymarios, 2010)

Vitamines	Moyennes (mg/L)
Vitamines hydrosolubles	
B1 (thiamine)	0,42
B2 (riboflavine)	1,72
B3 (acide nicotinique)	0,92
B5 (acide pantothénique)	3,6
B6 (pyridoxine)	0,48
B7 (inositol)	1 60
B8 (biotine)	0,036
B9 (acide folique)	0,053
B12 (cobalamine)	0,0045
C (acide ascorbique)	8
Vitamines liposolubles	
A (rétinol)	0,37
β-carotène	0,21
D (cholécalférol)	0,0008
E (tocophérol)	1, 1
K	0,03

Les vitamines hydrosolubles sont retrouvées à des concentrations pouvant varier selon le stade de lactation. Ainsi, une concentration deux fois plus importante est observée dans le colostrum par rapport au lait mature (Kon, 1951).

La thiamine, ou vitamine B1 est présente sous deux formes dans le lait : une première forme libre, et une seconde liée aux protéines ou phosphorylée.

La riboflavine, ou vitamine B2 est retrouvée dans le lait sous forme libre ou associée à des protéines ou des phosphates. C'est une vitamine qui peut entraîner des effets indésirables dans le lait puisqu'elle peut, via une réaction d'oxydoréduction, détruire la thiamine.

L'acide nicotinique, ou vitamine B3 est présent uniquement sous forme libre dans le lait à des concentrations très faibles. Cependant son précurseur, le tryptophane, est très présent dans la matrice laitière. C'est une vitamine qui est peu sensible à la chaleur, stable à l'air et à la lumière.

L'acide pantothénique, ou vitamine B5 est retrouvée uniquement sous forme libre. Elle est stable à l'air et la lumière mais est très sensible aux variations de pH ainsi qu'à la chaleur. C'est une vitamine importante puisque c'est un facteur de croissance pour beaucoup de bactéries.

La pyridoxine, ou vitamine B6, est présente sous forme libre dans le lait. Elle peut résister aux températures de traitement classique du lait (pasteurisation et thermisation) mais sera détruite au-delà de 140°C (température de stérilisation UHT).

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

La biotine, ou vitamine B8 est retrouvée dans le lait uniquement sous forme libre. Elle est stable à la chaleur et la lumière mais sensible à l'air.

L'acide folique, ou vitamine B9, est principalement retrouvé sous forme liée. Il est présent à des concentrations assez faibles dans le lait ce qui peut en faire un facteur d'enjeu de compétition nutritionnelle. C'est une vitamine qui est stable à la chaleur et aux variations de pH mais sensible à l'oxygène et à la lumière.

La cyanocobalamine, ou vitamine B12 est présente à de très faibles concentrations dans le lait. Elle est capable de résister à des températures de pasteurisation et de thermisation (10% de perte) mais est presque complètement détruite lors d'une stérilisation (90% de perte). C'est une vitamine qui est sensible à la lumière. Dans le lait, sa liaison au lactosérum est faible ce qui la rend beaucoup plus disponible que dans d'autres matrices ayant de plus fortes concentrations tels que les abats (jusqu'à 75 µg/100 g d'aliment dans du foie d'agneau de veau ou de génisse cuit).

Les vitamines liposolubles sont présentes et dissoutes dans la matière grasse ce qui fait qu'elles sont pratiquement absentes dans le lait demi-écrémé. Elles sont cependant présentes dans le lait entier, la crème mais également le beurre.

Parmi ces vitamines on retrouve la vitamine A, à des concentrations assez importantes. Avec elle, une forte quantité de précurseurs de caroténoïdes sont retrouvés, représentant 30% de son activité.

Le cholécalciférol, ou vitamine D, n'est présent qu'en très faible concentration et est parfois supplémenté par les industriels dans le lait de manière artificielle. Sa concentration est dépendante de l'environnement dans lequel se trouve la vache dont notamment son exposition au soleil.

Le tocophérol, ou vitamine E, est majoritairement constitué par l' α -tocophérol qui est son composé le plus actif. La seconde partie minoritaire est constituée de γ -tocophérol. Cette vitamine est connue pour être un puissant antioxydant protégeant les lipides des altérations oxydatives.

La vitamine K est synthétisée dans le rumen et présente en concentrations faibles dans le lait.

1.2. Composition microbienne

Les grandes catégories de micro-organismes répertoriées dans le lait sont les bactéries, les levures et les moisissures. Egalement, divers virus, protozoaires, et microalgues plus rarement, peuvent être retrouvés. Dans cette partie, nous n'évoquerons pas en détail tout le microbiote mais les principales flores rencontrées. D'après les références du paiement du lait à la qualité, le niveau de germes totaux dans le lait est stable depuis 1990 et se situe en moyenne aux alentours de 5.10^3 UFC/mL (Michel et al., 2001; Mallet, 2012). Cependant cette valeur n'indique pas les variations de la diversité

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

microbienne des laits. Celle-ci peut évoluer en fonction de la période de l'année (Doyle et al., 2017a; Li et al., 2018), du stade de lactation (Doyle et al., 2017b; Curone et al., 2018), de la race de la vache mais surtout d'une exploitation à une autre.

Le tableau 9 donne une image de la diversité bactérienne et fongique rencontrée dans les laits crus. Un nombre important des bactéries est observé, à Gram positif et négatif, appartenant à diverses espèces ainsi que des champignons (plus de 380 espèces au total détectées).

La mise en évidence de la diversité bactérienne et fongique dans les laits peut s'effectuer par méthode culturale ou par méthode non culturale. Il a été mis en évidence une forte similarité des espèces retrouvées par ces deux approches, bien que la méthodologie par approche culturale soit beaucoup plus fastidieuse (Quigley et al., 2012). Dans une autre étude, la comparaison entre une analyse d'ADNr 16S par rapport à la méthode culturale classique a montré que si l'on obtenait une diversité trois fois plus importante avec la première méthode, certains genres identifiés par la méthode culturale classique n'était quant à eux pas retrouvés (Breitenwieser et al., 2020).

Tableau 9 : Richesse bactérienne et fongique, en nombre d'espèces, rencontrée dans les laits crus
(Montel et al., 2014)*

Gram-positive bacteria	Milk	Gram-negative bacteria	Milk	Yeast genera	Milk
Lactic acid bacteria (<i>Firmicutes</i>)		Proteobacteria		<i>Candida</i>	17
<i>Aerococcaceae</i>	4	<i>Aeromonadaceae</i>	4	<i>Debaryomyces</i>	2
<i>Carnobacteriaceae</i>	4	<i>Alcaligenaceae</i>		<i>Dipodascus capitatus</i>	1
<i>Enterococcaceae</i>	11	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	3	<i>Geotrichum</i>	3
<i>Lactobacillaceae</i>	20	<i>Brucellaceae</i>	2	<i>Hyphopichia</i>	1
<i>Leuconostocaceae</i>	10	<i>Burkholderiaceae</i>	2	<i>Pichia</i>	3
<i>Streptococcaceae</i>	16	<i>Caulobacteraceae</i>	6	<i>Kluyveromyces</i>	3
	65	<i>Comamonadaceae</i>	3	<i>Saccharomyces</i>	3
Ripening bacteria (Actinobacteria + <i>Firmicutes</i>)		<i>Enterobacteriaceae</i>	23	<i>Torulaspora</i>	1
<i>Brevibacteriaceae</i>	3	<i>Halomonadaceae</i>	1	<i>Wickerhamomyces</i>	1
<i>Corynebacteriaceae</i>	17	<i>Methylobacteriaceae</i>	2	<i>Yarrowia</i>	1
<i>Microbacteriaceae</i>	20	<i>Moraxellaceae</i>	14	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1
<i>Micrococcaceae</i>	17	<i>Oxalobacteraceae</i>	2	<i>Cryptococcus</i>	14
<i>Nocardiaceae</i>	5	<i>Oceanospirillaceae</i>	1	<i>Kazachstania</i>	1
<i>Propionibacteriaceae</i>	5	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	1	<i>Malassezia</i>	2
<i>Staphylococcaceae</i>	27	<i>Pseudomonadaceae</i>	16	<i>Meyerozyma</i>	1
	94	<i>Rhizobiaceae</i>	2	<i>Rhodotorula</i>	4
<i>Listeriaceae</i>	5	<i>Rhodobacteriaceae</i>	2	<i>Trichosporon</i>	12
<i>Clostridiaceae</i>	8	<i>Xanthomonadaceae</i>	5		71
Unknown functions		<i>Vibrionaceae</i>			
<i>Bacillaceae</i>	9	<i>Xanthomonadaceae</i>	5		
<i>Paenibacillaceae</i>	2	<i>Flavobacteriaceae</i>	13		
<i>Dermabacteraceae</i>	8				
<i>Dietziaceae</i>	2				
<i>Intrasporangiaceae</i>	3				
	24				

*Une seule espèce a été retrouvée pour les familles suivantes : *Alcaligenaceae*, *Deinococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Gordoniaceae*, *Hahellaceae*, *Leptotrichiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Planococcaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Rikenellaceae*, *Sanguibacteraceae*, *Streptomyetaceae*, *Thermaceae* detected, *Ruminococcaceae* *Bacteroidaceae*, et *Bifidobacteriaceae*.

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

En Normandie, une étude a mis en évidence la stabilité dans le temps de la concentration de certains groupes microbiens dans du lait issu d'exploitations (Desmasuret et al., 1997). Parmi ce microbiote des laits crus, des bactéries lactiques, d'affinage, des levures, des moisissures mais également des bactéries indésirables voire potentiellement pathogènes sont retrouvées. Le tableau 10 représente le niveau des principaux groupes microbiens retrouvés dans le lait cru de tank par approche culturale. Trois principaux groupes dominent quantitativement : les bactéries à Gram négatif dont notamment le genre *Pseudomonas*, les bactéries d'affinage avec les *Staphylococcaceae* et les *Actinobacteria*, et les bactéries lactiques. Selon les exploitations, la relation de dominance entre ces trois groupes est variable, mais ce sont, en moyenne, les deux premiers qui prédominent. En effet, les bactéries halotolérantes (assimilables aux bactéries d'affinage) peuvent représenter jusqu'à 70% de la flore mésophile aérobie (Michel et al., 2001). Le genre *Pseudomonas*, pouvant représenter un pourcentage compris entre 0,6 et 15, est également retrouvé. Les groupes ayant les concentrations les plus faibles en moyenne dans le lait sont les spores aérobies, les moisissures et les entérobactéries dont les bactéries coliformes.

Tableau 10 : Niveaux de population des principaux groupes microbiens du lait cru de vache (d'après Montel et al., 2014)

Groupes microbiens présumés	UFC/mL
Bactéries coliformes	< 10
Bactéries propioniques	10^1 - 10^2
Enterobacteriaceae	10^1
<i>Enterococcus</i> sp.	10^1 - 10^2
<i>Lactobacillus</i> sp.	10^1 - 10^2
<i>Lactococcus</i> sp.	10^1 - 10^2
<i>Leuconostoc</i> sp.	10^1 - 10^2
Levures	10^1 - 10^2
Moisissures	< 10
<i>Pseudomonas</i> sp.	10^2 - 10^3
Spores aérobies	< 10
<i>Staphylococcus</i> sp. et <i>Actinobacteria</i>	10^2 - 10^3

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

1.2.1. *Bactéries lactiques*

En technologie fromagère, le groupe des bactéries lactiques joue un rôle clé de par son fort potentiel acidifiant et/ou ses propriétés protéolytiques et aromatiques. Parmi ce groupe, les *Lactococcus*, très présents dans le lait, sont retrouvés.

Le genre *Lactococcus* se caractérise par des espèces homofermentaires mésophiles ou psychrotrophes capables, pour bon nombre d'entre elles, de transformer le lactose en acide lactique (Holzapfel and Wood, 1995). Parmi les 19 espèces présentes, l'espèce *L. lactis* est majoritairement retrouvée dans la matrice laitière mais d'autres espèces telles que *garviae* et *raffinolactis* peuvent être également retrouvées (Klijn et al., 1995). La concentration du genre *Lactococcus* dans le lait est comprise entre 10^2 et 10^4 UFC/mL (Desmasures et al., 1997; Bouton et al., 2009; Quigley et al., 2012). D'autres études ont montré que cette concentration pouvait varier en fonction de la flore aérobie mésophile (FAM) (Holm et al., 2004; Dalmaso et al., 2008). En effet, il semble y avoir une corrélation entre la FAM et la concentration en lactocoques.

Parmi l'ancienne appellation du genre *Lactobacillus* (nouvelle classification en annexe 1), des espèces homofermentaires, hétérofermentaires strictes ou facultatives sont retrouvées (Felis et Dellaglio, 2015). Tout comme pour les lactocoques, la concentration en lactobacilles peut varier en fonction de la FAM (Farhan and Salik, 2007; Kagkli et al., 2007). Leur concentration dans le lait est comprise entre 10^1 - 10^4 UCF/mL (Mallet, 2012; Quigley et al., 2013). L'étude de Mallet a également mis en évidence une variation significative de la charge en *Lactobacillus* entre le lait de vache en période de pâturage par rapport au lait produit en stabulation. Beaucoup d'espèces de *Lactobacillus* sont retrouvées dans le lait, cependant l'espèce majoritaire semble être *L. paracasei* (Henri-Dubernet et al., 2008). Une étude a également montré la présence de l'espèce *L. parabuchneri* (Kagkli et al., 2007).

Peu d'informations sont disponibles quant à la concentration en *Leuconostoc*, bactéries hétérofermentaires mésophiles, dans le lait cru. Deux études réalisées en Normandie ont permis de quantifier des concentrations allant de 10^1 à 10^2 UFC/mL (Coiffier et Guéguen, 1992 ; Desmasures et al., 1997). Deux autres études plus récentes ont mis en évidence des concentrations de l'ordre de 10^2 à 10^3 UFC/mL (Mallet, 2012; Quigley et al., 2013). Dans la matrice laitière, l'espèce la plus retrouvée est *Lc. mesenteroides* (Coiffier et Guéguen, 1990).

En dehors de ces genres, d'autres, tel que le genre *Streptococcus* avec l'espèce *Streptococcus thermophilus*, notamment connue pour sa participation à l'acidification de la matrice et à la protéolyse, sont présents. Ce genre peut être retrouvé à des concentrations comprises entre 10^1 et 10^4 UFC/mL dans le lait (Quigley et al., 2013).

Si peu des données sont disponibles, on sait néanmoins que l'espèce *Carnobacterium*

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

piscicola (devenue *Carnobacterium maltaromaticum*) (Milliere and Lefebvre, 1994), ainsi que *Pediococcus acidilactici* (Hassan and Frank, 2011), peuvent être retrouvées dans le lait.

La famille des *Aerococcaceae* a été le taxon le plus retrouvé dans des échantillons de lait collectés dans des fermes localisées à Okayama et Hiroshima au Japon (Wu et al., 2019). Dans 16 fermes françaises, le genre *Aerococcus* a également été retrouvé dans le lait (Vacheyrou et al., 2011). Dans une autre étude, l'incidence de l'espèce *A. viridans* a été estimée à hauteur de 41,7% en hiver parmi 24 échantillons de lait (Mallet, 2012).

1.2.2. *Bactéries d'affinage*

Sous ces termes sont habituellement regroupés les staphylocoques à coagulase négative et autres *Staphylococcaceae*, ainsi que les *Actinobacteria*. Les genres *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus* et *Rhodococcus* sont notamment retrouvés.

En France, plusieurs études ont mis en évidence une concentration aux alentours de 10^2 UFC/mL d'*Actinobacteria*. Les bactéries d'affinage peuvent devenir dominantes dans le cas où la FAM est plus basse que $5 \cdot 10^4$ UFC/mL (Jackson and Clegg, 1966; Richard and Houssu, 1983; Ashenafi and Beyene, 1994).

Pour les staphylocoques, ils peuvent être retrouvés à des concentrations comprises entre 10^2 et 10^3 UFC/mL (Mallet, 2012). Dans une étude réalisée en 2012, les espèces les plus fréquentes dans le lait cru étaient des espèces indésirables en transformation fromagère, à savoir *S. haemolyticus* et *aureus* (Mallet et al., 2012). Cependant, d'autres espèces ayant un potentiel intérêt technologique étaient fréquemment identifiées, comme *S. carnosus* ou *S. saprophyticus*.

1.2.3. *Levures et moisissures*

A l'inverse des bactéries lactiques, les levures permettent de remonter le pH de la matrice fromagère. La concentration de ce groupe dans le lait se situe en moyenne aux alentours de 10^2 UFC/mL (Mallet, 2012). Dans une autre étude, le niveau de levures dans le lait était inférieur à 50 UFC/mL (Michel et al., 2001). Quelques cas de contaminations ont pu être mis en évidence avec des concentrations allant jusqu'à 10^4 UFC/mL (Denis et al., 2003). Parmi les genres de levures présents, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Yarrowia*, très importants en transformation fromagère, sont retrouvés. L'espèce majoritaire présente dans le lait varie en fonction des études. Ainsi peuvent être retrouvés *Kluyveromyces marxianus* (Mayoral et al., 2005), *Debaromyces hansenii* ou encore *Cryptococcus curvatus* (Lavoie et al., 2012). Dans une autre étude, les genres majoritaires retrouvés dans le lait étaient *Kluyveromyces*, avec 66.7% à 50% d'isolement à partir des

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

échantillons de lait cru et *Candida* avec 41.7% à 33.3% d'isolement (Mallet, 2012).

Les moisissures sont souvent dénombrées à des niveaux inférieurs à 10^1 UFC/mL (Desmasures, 1995; Desmasures et al., 1997; Michel et al., 2001). Les genres *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* et *Scopurialopsis* sont notamment retrouvés.

1.2.4. Bactéries à Gram négatif

Malgré une prédominance des bactéries à Gram positif (environ 80 à 90% de la flore), de nombreux genres de bactéries à Gram négatif sont retrouvés dans le lait (Breitenwieser et al., 2020). Ces bactéries sont présentes à des concentrations variables allant de 10^2 UFC/mL (Hogan et al., 1988) à 10^6 UFC/mL (Holm et al., 2004). Les principaux genres retrouvés dans le lait cru sont indiqués dans le tableau 11.

Tableau 11 : Principaux genres ou espèces de bactéries à Gram négatifs des laits crus et possibles sources environnementales (Montel et al., 2014)

Genres (espèces) dans les laits	Présence dans les environnements					
	Trayon	Eau	Litière, fèces	Machine à traire	Alimentation	Air
<i>Acinetobacter</i>	X					
<i>Enterobacter</i>	X		X			X
<i>Escherichia</i>	X	X				
<i>Chryseobacterium</i>	X					
<i>Hafnia (H. alvei)</i>		X		X		
<i>Pseudomonas</i>	X	X			X	
<i>Pantoea</i>	X				X	
<i>Psychrobacter</i>	X	X				
<i>Stenotrophomonas</i>	X					
<i>Sphingomonas</i>						X

Dans son étude, Mallet a mis en évidence une forte incidence des bactéries à Gram négatif dans le lait tels que *Stenotrophomonas maltophilia* (50,0%), et *Acinetobacter johnsonii* (45,8%) (Mallet, 2012). La présence des différents genres présents dans le tableau est en accord avec une autre étude effectuée sur des laits provenant de Norvège, d'Allemagne et d'Autriche (Fricker et al., 2011). Dans cette étude, portant sur l'identification par analyse en spectroscopie infrarouge, une majorité des bactéries identifiées ont été associées aux genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Chryseobacterium*.

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

La concentration en bactéries à Gram négatif peut évoluer notamment lors du transport et lors de la réfrigération. En effet, le stockage des lait crus à une température inférieure à 8°C va favoriser les bactéries psychrophiles ou psychrotrophes tels que *Hafnia alvei*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., ou encore *Chryseobacterium* sp. Cette augmentation peut se traduire par une concentration supérieure jusqu'à 3 log (Rasolofo et al., 2010). Si la présence de bactéries à Gram négatif est souvent associée à une dégradation des qualités organoleptiques du lait, certaines souches possèdent également un potentiel intérêt technologique. En effet, une étude a mis en évidence l'importance de certaines bactéries à Gram négatif tels que *H. alvei* et *Halomonas* sp. (Mounier et al., 2009). De nombreuses bactéries à Gram négatif sont retrouvées à la surface de fromages tel que le livarot (Tableau 12) où elle peuvent représenter 32% des bactéries présentes (Larpin-Laborde et al., 2011). Parmi les genres les plus retrouvés on pouvait compter *Alcaligenes*, *Hafnia*, *Proteus*, *Pseudomonas* et *Psychrobacter*.

Tableau 12 : Genres et espèces de bactéries à Gram négatifs retrouvés à la surface du livarot (Cogan et al., 2014)

Bactéries à Gram négatif	
Enterobactéries	Autres
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Halomonas</i> sp.
<i>Proteus</i> sp.	<i>Marinomonas</i> sp.
<i>Providencia heimbachae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Serratia grimesii</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	<i>Psychrobacter celer</i>
	<i>Psychrobacter</i> sp.
	<i>Raoultella planticola</i>

Toutes ou seulement une partie des espèces présentes dans les laits crus peuvent être ensuite retrouvées dans les fromages qui en sont issus.

2. Les fromages au lait cru

2.1. Positionnement de la filière fromagère française dans le monde

En 2018, environ 864 millions de tonnes de lait ont été produites dans le monde (CNIEL, 2020). En première position figure le lait de vache (81% du lait total produit), suivi par le lait de bufflonne (15%), de chèvre (2%), de brebis (1%) et des autres laits (1%). Cela représente plus de 703 millions de tonnes de lait de vache produites en 2018. Cette production ne cesse d'augmenter chaque année : en 2014, la filière laitière mondiale comptabilisait un total de 657,2 millions de tonnes de lait produites (soit une augmentation de presque 7%). La consommation de lait à travers le monde est en constante augmentation.

L'Europe représente l'un des plus gros producteurs avec 224 millions de tonnes de lait de vache en 2018. C'est donc tout naturellement que l'Europe figure sur la première marche du podium des exportateurs de lait, suivie par la Nouvelle-Zélande et les Etats-Unis.

En Europe les principaux pays producteurs de lait de vache sont l'Allemagne, suivie par la France et le Royaume-Uni. La transformation de ce lait en fromage représente plus de 10 millions de tonnes en Europe. La France contribue à elle seule à 18% de la production Européenne de fromage, ce qui la classe en deuxième position après l'Allemagne dans la catégorie des pays les plus producteurs de fromage. La filière laitière représente un moteur de l'économie Française et est classée en seconde position du secteur de l'agroalimentaire après la filière viande.

En France, 200 635 tonnes de fromages au lait cru ont été produites en 2018 (CNIEL, 2020). Parmi ces fromages, 45 possèdent l'appellation d'origine protégée (AOP). En France ce sont 10,3% du lait de la collecte qui sont utilisés en AOP (CNAOL, 2019). Cette appellation représente pour le consommateur un gage de qualité, une authenticité et une origine géographique spécifique du produit. Elle assure au consommateur que les étapes de fabrication (du lait jusqu'à l'affinage) se déroulent dans une aire géographique qui est délimitée par l'appellation. Cette zone géographique délimitée permet d'apporter au produit des caractéristiques bien particulières. En effet, les zones de pâturages possèdent un sol ayant une nature et une composition bien spécifiques, conférant au produit final des qualités organoleptiques spécifiques à la région.

Pour le consommateur, l'appellation AOP est un signe de qualité vis-à-vis du produit puisqu'elle reflète le respect d'un cahier des charges très strict et permet une totale transparence sur les pratiques et l'origine du produit. En Normandie, quatre fromages en AOP sont retrouvés : Le Pont-l'Évêque, le Livarot, le Neufchâtel et le Camembert de Normandie.

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

2.2. Les fromages au lait cru en Normandie

La France est reconnue pour ses fromages au lait cru, particulièrement pour leurs qualités organoleptiques bien particulières. A l'échelle nationale, se sont 200 635 tonnes de fromages au lait cru qui ont été produites en 2018, avec une majorité de fromages à pâte pressée cuite suivie des pâtes pressées non cuites. Les fromages à pâte molle, à pâte filée, à pâte persillée et les fromages frais sont également retrouvés. Dans la filière AOP Française, 75% des fromages sont fabriqués à partir de lait cru. En Normandie, 10 700 tonnes de fromages AOP, dont 75% sont au lait cru, ont été vendues en 2019.

2.2.1. *Le Pont l'évêque*

Au moyen-âge, l'ancêtre du Pont-l'Évêque porte un autre nom : l'Angelot, traduisant la provenance de ce fromage, le pays d'Auge. De par sa popularité, il voyage à travers les régions et commence à se développer en Normandie. Au XVII^{ème} siècle, il acquiert une forme carrée permettant de le différencier de son ancêtre, l'Angelot. Il sera renommé « Pont l'Evêque » de par la ville dans laquelle les producteurs le vendaient. C'est un fromage à pâte molle et à croûte fleurie pouvant être lavée ou brossée. C'est un fromage à croûte de couleur ivoire à jaune paille avec un cœur souple. Il a obtenu l'appellation d'origine contrôlée (AOC) en 1972 et l'appellation AOP en 1996. Selon le cahier des charges, les exploitations doivent comporter au moins 50% de vaches laitières de race normande dans leur effectif (source INAO, <https://www.inao.gouv.fr>). Celles-ci doivent pâturer au moins 6 mois dans l'année. On le retrouve sous trois formats : un premier fait à partir de lait entier, un deuxième à partir d'un mélange entre lait entier et lait écrémé et enfin un dernier à partir de lait écrémé. En 2019 ce sont 2 232 tonnes de commercialisées (source <https://www.routedesfromagesdenormandie.fr>). Cependant, à l'heure actuelle, seulement 20% des fromages sont fabriqués à partir de lait cru.

2.2.2. *Le Livarot*

Le Livarot fait partie des fromages les plus anciens de Normandie. Au XVII^{ème} siècle, les fermiers voulaient valoriser leur lait au maximum et utilisaient le lait écrémé, sous-produit de la crème et du beurre, pour faire du fromage. On parlait alors de Livarot en blanc puisque l'affinage n'était pas effectué par les fermiers mais par les acheteurs sur les marchés ou par les affineurs. A la fin du XIX^{ème}, il est le fromage le plus consommé de Normandie. C'est un fromage à pâte molle et croûte lavée, fabriqué dans le pays de l'Auge exclusivement. Il est facilement reconnaissable par ses cinq laïches de roseaux qui l'entourent et qui lui valent le surnom de « Colonel ». L'utilisation de ces bandelettes de roseaux permettait de maintenir le fromage pendant sa fabrication car il contenait peu de matière grasse. Il obtient le statut de fromage AOC en 1975 puis AOP en 1996. Depuis mai 2017,

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

la fabrication du Livarot s'effectue exclusivement à partir de lait provenant de vaches laitières de race Normande. Celles-ci doivent pâturer dans le bocage Normand au moins 6 mois dans l'année. La fabrication du Livarot peut s'effectuer à partir de lait cru et/ou pasteurisé ou thermisé. En 2019, ce sont plus de 865 tonnes de livarot AOP qui ont été commercialisées (source <https://www.routedesfromagesdenormandie.fr>).

2.2.3. Le Neufchâtel

Ce fromage fut initialement élaboré dans les bocages du Pays de Bray. Au XVIII^{ème} siècle, il devient l'un des fromages les plus célèbres en France. C'est un fromage à pâte molle et à croûte fleurie, facilement reconnaissable par sa forme souvent en cœur. Il a obtenu son appellation AOC en 1969 puis AOP en 1996. Le cahier des charges de l'AOP exige que le lait mise en œuvre soit issue d'un troupeau contenant au minimum 60% de vaches laitières de race Normande. Tout comme le Livarot, ces vaches doivent pâturer au moins 6 mois de l'année. Il est essentiellement fabriqué à partir de lait cru. Plus de 1 600 tonnes de fromages ont été commercialisées en 2019 (source Fromages AOP de Normandie).

2.2.4. Le Camembert de Normandie

Le Camembert de Normandie est un fromage emblématique. Son invention remonterait à 1791 lors de la Révolution lorsqu'un abbé réfractaire aurait livré le secret de cette recette à Marie Harel qui le cachait dans sa ferme. Très populaire et mondialement imposé, c'est au début du XX^{ème} siècle que les fromageries normandes créent le Syndicat des fabricants du Véritable Camembert de Normandie (SVCN). Il a obtenu le statut de fromage AOC en 1983 puis AOP en 1996. Le Camembert de Normandie est un fromage à pâte molle et à croûte fleurie fabriqué exclusivement à partir de lait cru. Pour le fabriquer, le lait doit être issu de vaches dont au moins 50% sont de race Normande et ayant pâturé au moins 6 mois de l'année. Ce sont plus de 5 994 tonnes de fromages commercialisées en 2019 (source <https://www.routedesfromagesdenormandie.fr>).

2.2.4.1. Fabrication du Camembert de Normandie AOP : spécificités

Selon le cahier des charges homologué par le décret n°2013-1059 du 22 novembre 2013, (source www.routedesfromagesdenormandie.fr), l'appellation Camembert de Normandie désigne un fromage à pâte molle fait à partir de lait cru. C'est un fromage qui doit contenir au moins 45 grammes de matière grasse pour 100 grammes d'extrait sec total. Il doit avoir une forme ronde avec un diamètre compris entre 10,5 et 11 cm et un poids de 250 grammes minimum. La croûte blanche de ce fromage

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

est dite fleurie et doit présenter une moisissure superficielle. Selon l'affinage, une pigmentation rouge peut apparaître, due notamment à *Brevibacterium linens* et/ou *B. aurantiacum*.

Le cahier des charges impose aux éleveurs des conditions d'élevage très strictes que ce soit au niveau des conditions de pâturage des vaches, d'alimentation du troupeau ou de la collecte du lait. Depuis le 1^{er} Mai 2017 les vaches laitières Normandes doivent représenter au moins 50% du troupeau et l'ensemble doit pâturer au moins 6 mois dans l'année.

Tout comme les autres fromages AOP, l'appellation Camembert de Normandie est définie dans une aire géographique bien spécifique. La figure 1 représente les zones permettant cette appellation. Elle s'étend sur les départements du Calvados, de la Manche, de l'Orne et d'une partie de l'Eure.

Selon le cahier des charges le stockage du lait cru permettant la fabrication du Camembert de Normandie ne doit pas excéder 72 heures à compter de l'heure de la traite la plus ancienne jusqu'au début de la maturation. Le lait ne peut en aucun cas être chauffé à plus de 40°C, ni être bactofugé, ultra- ou micro-filtré. Lors du processus de fabrication, aucun autre ingrédient que la présure, le sel, le chlorure de calcium, les cultures inoffensives de bactéries, moisissures et levures, ne peut être ajouté. L'emprésurage s'effectue dans une bassine à une température maximale de 37°C.

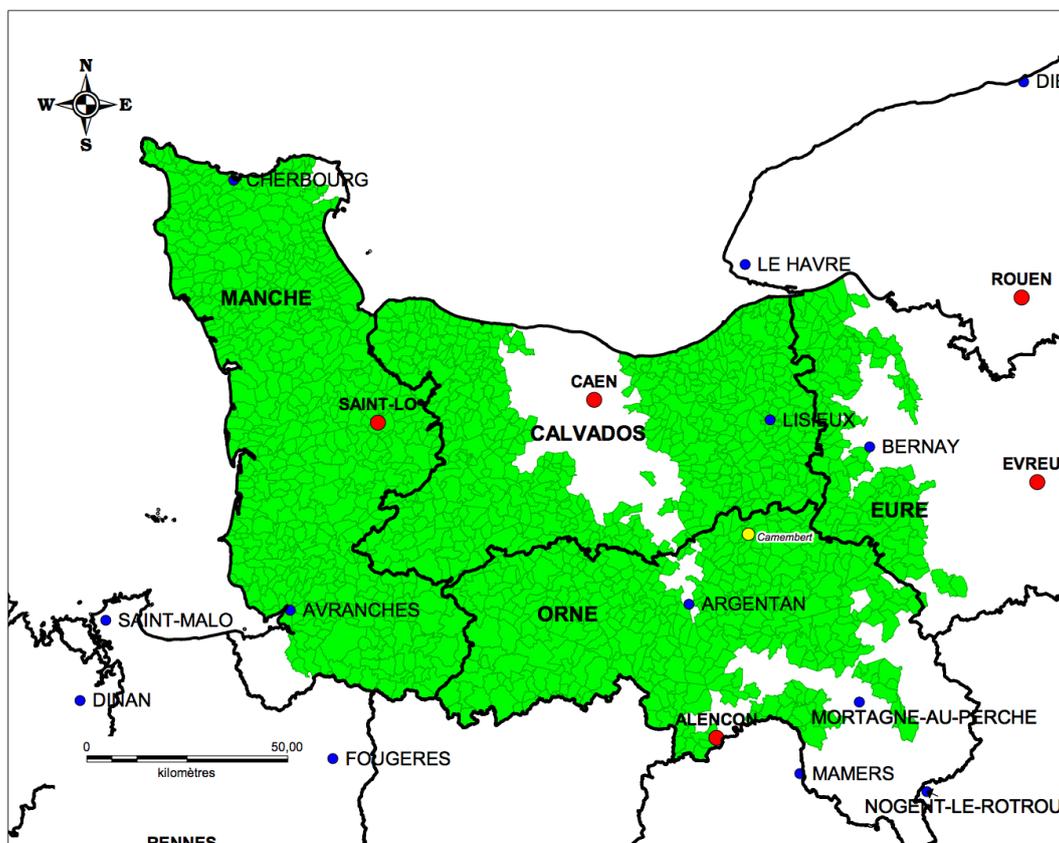


Figure 1 : Aire géographique du Camembert de Normandie (Source : BDCARTO-IGN, INAO, AOUT 2010)

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

L'utilisation d'un lait provenant de vaches de race Normande apporte des propriétés uniques à ce fromage. En effet, cette race possède un lait ayant la teneur de matière protéique la plus élevée parmi toutes les autres races laitières (à l'exception de la race Jersiaise). De plus, l'aptitude à la coagulation du lait est plus importante en raison de la présence de certains variants génétiques de la caséine, peu fréquents chez d'autres races laitières : β -Cn A³ et κ -Cn B. On obtient donc, grâce à ce lait, une coagulation et un temps de raffermissement du gel plus rapides (Remeuf and Vassal, 1991). La composition nutritionnelle du Camembert de Normandie au lait cru est reportée dans le tableau 13 ci-dessous. Pour 100 g de fromage, plus de la moitié est de l'eau. Les deux autres composants majeurs sont les protéines et les matières azotées totales. Si le fromage contient de nombreux acides aminés, vitamines et minéraux, ceux-ci sont présents, pour certains, à des concentrations très faibles.

Tableau 13 : Composition nutritionnelle du Camembert au lait cru (source : CIQUAL 2008)

Nom	Unité	Teneur moyenne pour 100g
Eau	g	55,9
Protéines	g	20,7
Glucides	g	traces
Lipides	g	20,3
Sucres	g	< 0,2
Cendres	g	2,59
Acides organiques	g	0,98
AG saturés	g	14,1
Cholestérol	mg	64,6
Sel chlorure de sodium	g	1,45
Calcium	mg	380
Chlorure	mg	981
Cuivre	mg	0,02
Fer	mg	0,09
Iode	μ g	20
Magnésium	mg	18
Manganèse	mg	0,03
Phosphore	mg	370
Potassium	mg	160
Sélénium	μ g	< 20
Sodium	mg	580
Zinc	mg	2,8
Rétinol	μ g	181
Vitamine D	μ g	< 0,25
Vitamine E	mg	0,46
Vitamine K1	μ g	3,1
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	< 0,015
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	0,6
Vitamine B3 ou PP ou Niacine	mg	10,9
Vitamine B5 ou Acide pantothénique	mg	0,44
Vitamine B6	mg	0,26
Vitamine B9 ou Folates totaux	μ g	88
Vitamine B12	μ g	1,61

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

2.2.4.2. Processus de fabrication

Le processus de fabrication du Camembert de Normandie AOP au lait cru est détaillé dans la figure 2 ci-dessous.

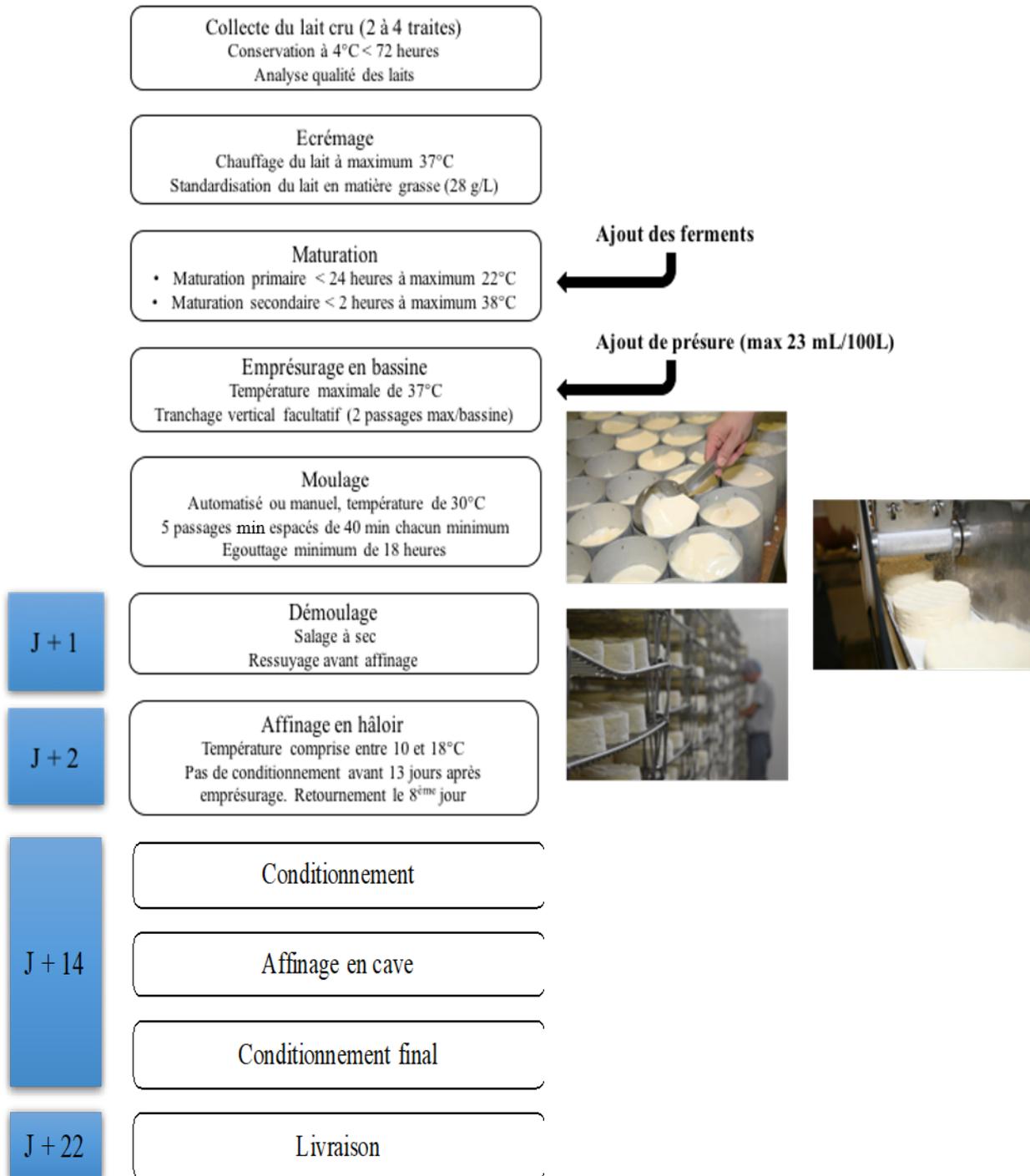


Figure 2 : Processus de fabrication du Camembert de Normandie (d'après le cahier des charges n° 2008-984).

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

Dans un premier temps le lait est collecté chez les producteurs puis standardisé à environ 30 g/L de matière grasse. Cela peut s'effectuer par un écrémage d'une partie du lait qui est ensuite mélangé avec un lait entier, ou par un crémage naturel. Une fois l'écrémage réalisé, l'ensemble des ferments (lactiques et d'affinage) sont ajoutés au lait. Parmi ces ferments, une flore mésophile lactique mixte est majoritairement retrouvée, avec les genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Une flore d'affinage, composée notamment des espèces fongiques *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti*, mais également d'autres genres tel que *Kluyveromyces* est retrouvée. En dehors des levures sont également retrouvées des *Actinobacteria*, avec les genres *Brevibacterium* et *Micrococcus*. D'autres ferments appelés non-starter LAB (NSLAB) peuvent être introduits tels que les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*. Le stockage du lait entre la collecte et l'étape de maturation primaire ne peut pas excéder 72 heures. La maturation du lait permet de rétablir les équilibres minéraux ayant été perturbés par le stockage au froid et la réactivation de la flore microbienne présente dans le lait cru. Elle s'effectue en deux étapes : une première maturation à froid ne pouvant dépasser 24 heures et à une température maximale de 22°C, et une seconde maturation, facultative, de maximum 2 heures et à une température ne pouvant excéder 38°C. Cette étape de maturation va permettre d'optimiser la coagulation du lait lors de l'ajout de présure.

Le lait est ensuite emprésuré dans des bassines de maximum 330 litres. La dose maximale pour 100 L de lait est de 23 mL de présure animale à une force équivalente à 520 mg de chymosine par litre. Cette étape s'effectue à une température maximale de 37°C. Une étape consistant à trancher le caillé verticalement peut être réalisée. Si cette étape est ajoutée, l'écartement des lames du tranche-caillé doit être au minimum de 2,5 cm, et seulement deux passages peuvent être effectués par bassine.

Le moulage des fromages est ensuite réalisé après l'étape de tranchage. Pour cela le caillé est prélevé des bassines, soit manuellement à la louche ou alors par un système automatisé. Il est ensuite déposé dans des moules en 5 passages minimum, chacun des passages étant espacé d'au moins 40 minutes. L'égouttage s'effectue de manière spontanée pendant une période de 18 heures à partir du premier passage. Les fromages sont ensuite retournés une fois et plaqués à l'aide d'une plaque métallique exerçant une légère pression et optimisant l'égouttage.

Le lendemain, les fromages sont démoulés, salés à sec puis peuvent être ressuyés 24 heures maximum avant l'étape d'affinage. L'affinage s'effectue ensuite dans des hâloirs à des températures comprises entre 10 et 18°C à 90-95% d'humidité relative. Cette étape est très importante car la remontée de pH provoquée par la multiplication des microorganismes d'affinage (ferments et flore naturelle) va permettre de donner au fromage ses qualités organoleptiques. Le conditionnement des fromages ne peut pas s'effectuer avant le 13^{ème} jour suivant l'emprésurage. Le Camembert de Normandie est ensuite emballé selon le cahier des charges, à savoir individuellement, dans un papier

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

et dans une boîte en bois de forme cylindrique, à l'exception du couvercle servant de support à l'étiquette qui peut être en compobois (fibres de bois agglomérées avec du polypropylène). L'affinage des fromages en cave peut durer en pratique jusqu'à 35 jours. Les fromages ne peuvent pas quitter le lieu de fabrication avant le 17^{ème} jour suivant l'emprésurage et la livraison aux clients ne peut se faire avant le 22^{ème} jour.

2.2.4.3. Composition microbienne et flore d'intérêt technologique

La transformation du lait cru en Camembert de Normandie entraîne une modification des conditions physico-chimiques et, en conséquence, une évolution du microbiote présent. La figure 3 ci-dessous représente la succession d'activités et d'implantation du microbiote lors de la transformation en fromage.

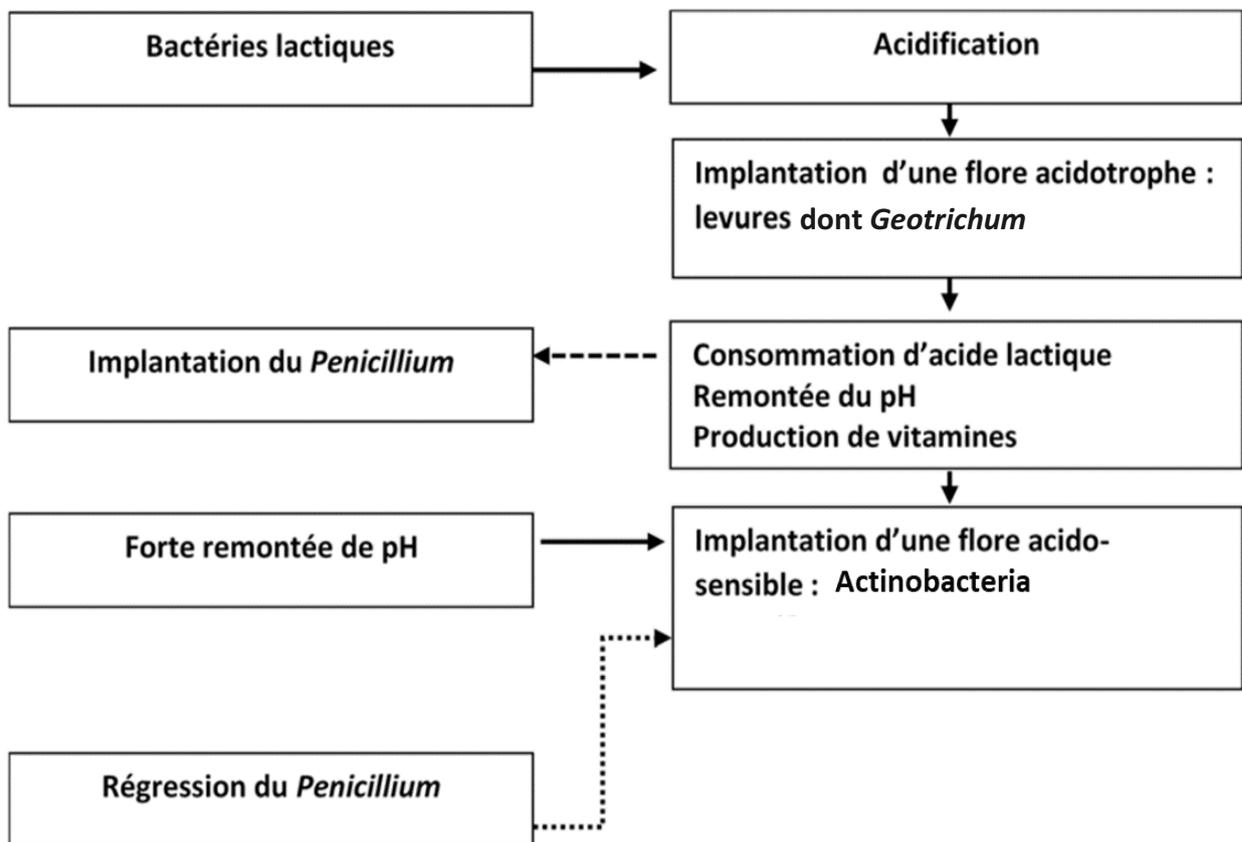


Figure 3 : Schéma représentant la succession des différentes bactéries et champignons au cours du processus de transformation du fromage (Institut de l'élevage, 2016)

De nos jours la fabrication de fromages s'effectue rarement à partir uniquement des microorganismes présents naturellement dans le lait cru. C'est pour cela qu'après la collecte du lait, des ferments sont ajoutés dans la matrice. Ces ferments permettent une plus grande maîtrise de la

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

transformation et des qualités organoleptiques des fromages. Parmi ces ferments, deux catégories sont retrouvées : les levains lactiques et les levains d'affinage.

2.2.4.3.1. Les bactéries lactiques

Lors du processus de fabrication du fromage, les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la transformation du lait en caillé. Il en existe deux types : les mésophiles et les thermophiles. Dans le Camembert de Normandie, ce sont principalement des levains mésophiles appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* qui sont utilisés. La concentration de ces ferments est souvent ajustée entre 10^5 et 10^7 UFC/mL dans les laits, permettant d'obtenir dans les fromages des taux de populations aux alentours de 10^9 UFC/g. Plusieurs études mettent en évidence que les bactéries lactiques sont majoritaires aussi bien en surface qu'au cœur du fromage (Lenoir, 1963; Mallet, 2012). La concentration en *Lactococcus* (anciennement streptocoques lactiques) reste à 10^9 UFC/g au cours des 30 jours d'affinage.

L'ajout de ferments mésophiles va permettre la production d'acide lactique mais aussi, pour certaines souches, la production de précurseurs et/ou de composés aromatiques caractéristiques. Ces levains jouent un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques du fromage. En effet, le genre *Leuconostoc* est notamment connu pour sa production de CO₂ à partir du catabolisme du citrate et du lactose permettant, avec dans le cas de fromages tel que le Camembert, l'apparition de persillage dans la pâte du fromage (Collin and Humbert, 2018). Il synthétise également des composés aromatiques caractéristiques du goût et de l'odeur du fromage tels que le diacétyl et l'acétoïne, produits à partir du métabolisme du citrate, caractéristiques des notes « beurre » et « gras » ou encore un ester d'acide acétique donnant une note « fromage ».

En plus de leurs qualités d'acidifiant dans cette matrice, les bactéries lactiques sont reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la santé et leur fort potentiel à inhiber des pathogènes. Beaucoup de bactéries lactiques possèdent le statut QPS (Qualified Presumption of Safety, présomption d'innocuité reconnue) (EFSA, 2017) et possèdent un long historique d'utilisation dans les produits laitiers (fromages, yaourt...).

Les bactéries lactiques non acidifiantes, NSLAB, peuvent également avoir un rôle de ferments. Ces bactéries correspondent à une flore lactique dite secondaire issue du lait et/ou de l'environnement de la fromagerie. Parmi ces bactéries présentes dans les fromages et notamment dans le Camembert de Normandie, on retrouve principalement le genre *Lactobacillus* (voir correspondances avec les nouveaux noms de genres en annexe 1), avec les espèces hétérofermentaires facultatives *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. plantarum* (Casey et al., 2006; Solieri et al., 2012; Santarelli et al., 2013; Montel et al., 2014; Ricciardi et al., 2015). Les espèces *Lb. paracasei*

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

et *Lb. plantarum* sont les deux espèces les plus fréquemment rencontrées (Henri-Dubernet et al., 2004). Malgré leur pouvoir peu acidifiant, ces bactéries peuvent jouer un rôle important dans la production de composés et participer aux qualités organoleptiques des fromages. Il a également été mis en évidence une coopération entre les NSLAB et les levains lactiques notamment entre *L. lactis* subsp. *cremoris* et *Lb. paracasei* pour la production de composés aromatiques dans les fromages (Kieronczyk et al., 2003). Cette coopération pour la production de composés aromatiques a aussi été mise en évidence dans des fromages de type cheddar avec ces deux mêmes espèces (Desfossés-Foucault et al., 2014). En plus de ces propriétés, les NSLAB peuvent aussi produire des composés antimicrobiens, ce qui représente un avantage dans une matrice non traitée par la chaleur tel que le lait cru. Elles bénéficient pour certaines du statut QPS et peuvent, comme certaines souches de *Lb. casei*, être impliquées dans la dégradation d'histamine et de tyramine en matrice fromagère (Herrero-Fresno et al., 2012).

2.2.4.3.2. Les levures et moisissures

Lors de la phase de caillé acide, ce sont les levures telles que *Candida*, *Geotrichum* et *Kluyveromyces* qui dominent dans la matrice en plus des bactéries lactiques. D'après l'étude de Lenoir (1963), les levures à la surface du fromage sont présentes à $5 \cdot 10^6$ UFC/g dès les 3^{èmes} et 4^{èmes} jours de fabrication. Après 10 jours, les levures atteignent une concentration avoisinant les 10^8 UFC/g (Lenoir, 1963). A 30 jours, la concentration est d'environ 10^5 UFC/g (Henri-Dubernet et al., 2008). Au cœur du fromage, la concentration est plus faible avec des concentrations de $5 \cdot 10^5$ UFC/g après 7 jours.

Les levains d'affinage interviennent après l'acidification du lait et sa coagulation. Ce sont, dans un premier temps, les flores fongiques qui vont venir s'implanter, grâce à leur tolérance aux pH faibles. L'ajout de levures technologiques peut s'effectuer par la saumure ou sous forme de cultures d'affinage à des concentrations pouvant varier entre 10^4 et 10^6 UFC/mL. De par leur tolérance aux pH faibles et à de fortes concentrations en NaCl, elles sont retrouvées en nombre dès les premiers jours d'affinage. Les principales espèces utilisées en tant que levains d'affinage dans les fromages sont *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Desmasures and Irlinger, 2018). Dans le Camembert de Normandie, ce sont les espèces *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae* qui prédominent (Baroiller et al., 1990; Jeantet and Croguennec, 2018), mais aussi la levure *Geotrichum candidum*, dont le mycélium présent à la surface des fromages permet d'obtenir une croûte ferme et épaisse (Eliskases-Lechner et al., 2011), et impactant également la texture. Cette levure est aussi utilisée pour sa vitesse de recouvrement limitant l'implantation de flores pathogènes

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

(Molimard, 1995). Les levures jouent un rôle important dans la transformation du fromage, notamment en modifiant la texture de celui-ci grâce à la neutralisation du pH (Vassal et al., 1986) ainsi qu'en permettant une meilleure répartition des minéraux (Vassal et al., 1986) dans la matrice. Elles possèdent également des propriétés enzymatiques permettant la lipolyse, protéolyse, la dégradation des acides aminés et des acides gras. Au niveau de la matrice, cela se traduira par la synthèse de composés aromatiques caractéristiques des qualités organoleptiques des fromages. Une diminution rapide du lactose en surface du fromage est observée dès le début de l'affinage par les levures. Le lactose disparaît après 10 jours d'affinage en surface et vers le 30^{ème} jour pour le cœur (Choisy et al., 1997a).

La croissance des levures est ensuite suivie par celle des moisissures. Dans le Camembert, la moisissure technologique est *Penicillium camemberti*, responsable de l'aspect caractéristique de la croûte fleurie du Camembert. Cette moisissure permet d'instaurer un gradient de pH allant de la croûte jusqu'au cœur du Camembert, grâce à sa consommation d'acide lactique ainsi qu'à la production d'ammoniac (Graet et al., 1983). Après 10-12 jours elle a complètement recouvert la surface du fromage, lui donnant cet aspect de feutrage blanc fleuri. Elle participe activement à la lipolyse, la protéolyse ainsi qu'à la dégradation d'acides aminés et acides gras, entraînant la production de composés aromatiques tels que des composés soufrés, de l'ammoniac, des méthylcétones, des alcools, des esters, des aldéhydes ainsi que des lactones (Jollivet et al., 1992).

2.2.4.3.3. Les bactéries acido-sensibles

Le développement des levures va permettre le passage d'un pH acide à un pH proche de la neutralité en surface du fromage, favorisant la croissance d'autres genres bactériens acido-sensibles tels que les *Corynebacterium*, *Brevibacterium* et *Micrococcus*. Dans le cas du Camembert, la classe des *Actinobacteria* est notamment retrouvée avec des genres tels que *Arthrobacter* et *Brevibacterium*. Dans son étude, Mallet (2012) a mis en évidence une augmentation de concentration en actinobactéries au cours du processus de transformation, passant de $1,9.10^3$ à J+14 à $6,5.10^7$ UFC/g à J+50. Cependant une certaine variation (facteur 100) a été observée entre les 3 fromageries étudiées. Dans le fromage, des concentrations de 10^9 UFC/g ont été retrouvées pour le genre *Micrococcus* (Lenoir, 1963). Ces bactéries d'affinage acido-sensibles vont contribuer à dégrader les lipides, protéines, acides aminés et acides gras de la matrice fromagère et ainsi apporter des caractéristiques aromatiques spécifiques.

Le genre *Arthrobacter* fait partie des bactéries d'affinage largement retrouvées dans la croûte des fromages européens (Quigley et al., 2012; Irlinger et al., 2015). L'espèce *A. nicotianae* reclassée d'abord *Arthrobacter arilaitensis* pour la plupart des souches laitières, et renommée depuis

INTRODUCTION : **Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère**

Glutamicibacter arilaitensis, essentielle à l'affinage des fromages à pâte molle (Bockelmann et al., 2005), est notamment retrouvée.

Le genre *Brevibacterium* est fortement associé à la couleur orangée qu'il apporte à d'autres fromages tels que le Livarot ou le Munster (Guyomarc'h et al., 2000; Leclercq-Perlat et al., 2004; Leclercq-Perlat and Spinnler, 2010). Dans le cas des fromages à pâte molle tel que le Camembert, l'espèce *B. linens* représente 30% des bactéries en surface (Choisy et al., 1997b). Initialement, le ferment du rouge correspondait à l'espèce *B. linens*, depuis répartie en 4 espèces : *B. linens*, *B. aurantiacum*, *B. antiquum* et *B. permense* (Gavrish et al., 2004). La plupart des souches fromagères étaient très proches de la souche de référence maintenant identifiée comme étant la souche type de *B. aurantiacum*. On peut donc penser que bon nombre des souches préalablement identifiées en tant que *B. linens* soient reclassées en *B. aurantiacum*.

L'utilisation d'espèces bactériennes telle que *Brevibacterium aurantiacum*, ou ferment du rouge, comme ferment d'affinage dans le Camembert de Normandie est très répandue. On attribue à cette espèce des propriétés technologiques très intéressantes avec notamment la production de substances antimicrobiennes (Rattray and Fox, 1999) ou encore la production de composés volatils, notamment soufrés (Martinez-cuesta 2013).

Toutes ces flores technologiques interviennent dans le bon fonctionnement du processus permettant la fabrication du Camembert. Néanmoins, certaines sont capables en plus de synthétiser des composés antimicrobiens permettant de lutter contre l'implantation de pathogènes potentiellement présents dans la matrice lait cru. En effet, le lait cru peut être source de bactéries potentiellement pathogènes pouvant s'implanter lors du processus de fabrication. Parmi ces bactéries sont retrouvés des *Campylobacter* thermotolérants, *Listeria monocytogenes*, des *Escherichia coli* mais également *Salmonella enterica*.

2.3. Contamination des produits laitiers par des bactéries potentiellement pathogènes

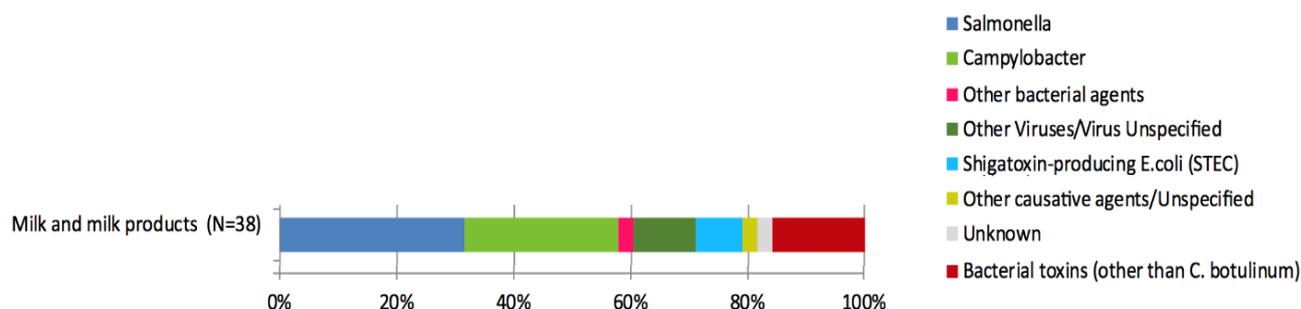
Le lait cru apporte une richesse microbienne caractéristique de certains fromages mais peut être source de certaines bactéries potentiellement pathogènes, qui s'implantent de façon variable dans les fromages en fonction des technologies. C'est particulièrement le cas des fromages à pâte pressée non cuite et des fromages à pâte molle vis-à-vis d'*Enterobacteriaceae* pathogènes dont les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) et les *Salmonella*.

Du fait de son absence de traitement, la matrice lait cru est plus sensible à la colonisation par des pathogènes. D'après l'EFSA les genres ou espèces majoritairement responsables de contaminations dans le lait cru sont *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* productrices de

INTRODUCTION : Caractéristiques des laits crus et transformation fromagère

shiga-toxines, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, et *Yersinia* (EFSA and ECDC, 2019)

La figure 4 montre la répartition des agents pathogènes associés à des foyers épidémiques de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) liés à la consommation de lait et produits laitiers en Europe. *Salmonella* et *Campylobacter* représentent les deux pathogènes les plus représentés pour ce type de produits alimentaires (lait, fromages et produits laitiers divers). Le genre *Salmonella* représente près de 30% des genres retrouvés en matrice lait et produits laitiers, suivi de *Campylobacter* avec un peu moins de 30%. Viennent ensuite les toxines bactériennes, les virus et les *E. coli* productrices de shiga-toxines (STEC).



Other bacterial agents include *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), *Enterococcus*, *Leptospira* spp., *Shigella* spp., *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica* and other unspecified bacteria. Bacterial toxins other than *Clostridium botulinum* include toxins produced by *Bacillus*, *Clostridium* other than *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus* and other unspecified bacterial toxins. Other viruses include adenovirus, flavivirus, hepatitis E, rotavirus and other unspecified viruses. Other causative agent include atropine, lectin, monosodium glutamate, chemical agents unspecified. Milk and milk products include: cheese, dairy product (other than cheeses), milk.

Figure 4 : Distribution et fréquences des agents pathogènes associés à des TIAC liées à la consommation de lait et produits laitiers (Figure adaptée de EFSA 2019)

Salmonella fait partie des agents potentiellement pathogènes les plus retrouvés en lait et dans produits laitiers en 2019. Cette contamination par *Salmonella* est aussi associée à la recrudescence de ce pathogène dans les troupeaux et notamment les troupeaux laitiers. La suite de cette introduction sera orientée vers le genre *Salmonella*.

CHAPITRE II : Les *Salmonella* en environnement laitier

1. Caractéristiques générales du genre *Salmonella*

1.1. Taxonomie et nomenclature du genre *Salmonella*

Salmonella fut découverte en 1884 par Theobald Smith dans le cadre de ses recherches sur la peste porcine. Le supérieur de T. Smith, Daniel E. Salmon, revendiqua la découverte de cette bactérie qu'il nomma d'après-lui (Hoogstral, 1986). Plus tard il fut découvert que cette bactérie n'était pas à l'origine de cette maladie et le nom d'espèce fut révisé en tant que *Salmonella enterica* dans les années 1980, tel que suggéré par Kaufman and Edwards (1952), afin d'éviter toute confusion (Euzéby, 1999). Le genre *Salmonella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (Tableau 14).

Tableau 14 : Classification du genre *Salmonella*

Classification du genre <i>Salmonella</i>	
Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>

Aujourd'hui, deux espèces sont décrites parmi ce genre (Popoff et al., 2004) : *S. enterica* et *S. bongori*. Une troisième espèce nommée *Salmonella subterranae* fut proposée en 2004 (Shelobolina et al., 2004) mais ne fut pas conservée (Grimont and Weill, 2007). L'espèce *Salmonella bongori* ne possède pas de sous-espèces, tandis que six sont décrites sur la base de critères phénotypiques chez l'espèce *enterica* (Reeves et al., 1989) : *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* et *S. enterica* subsp. *indica*.

Les sous-espèces de l'espèce *enterica* ainsi que l'espèce *bongori* sont également subdivisées en sérovars suivant le schéma de White-Kauffmann-Le Minor (Le Minor, 1992). Cette liste est actualisée régulièrement par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en collaboration avec l'Institut Pasteur. A ce jour, plus de 2 600 sérovars ont été décrits sur la base des antigènes somatiques (O), capsulaires (Vi) et flagellaires (H) des bactéries (Tableau 15). Les sérovars de la sous-espèce *enterica* sont fréquemment caractérisés par un nom correspondant à un lieu géographique ou à leur

formule antigénique, tandis que ceux de l'espèce *bongori* le sont le plus souvent par leur formule antigénique.

Tableau 15 : Récapitulatif représentant le nombre de sérovars en fonction des espèces et sous-espèces de *Salmonella* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014)

Espèces	Sous espèces	Nombre de sérovars
<i>Salmonella enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1 586
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	522
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	102
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	338
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	76
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>	-	22
Total (genre <i>Salmonella</i>)		2 659

1.2. Morphologie, caractères culturels et biochimiques du genre *Salmonella*

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif aéro-anaérobie facultatifs, de taille comprise entre 0,7-1,5 µm par 2,0-5,0 µm. Elles sont mobiles grâce à la présence d'une ciliature péritriche (sauf pour *S. Gallinarum* et *Pullorum*). Ce sont des organismes mésophiles dont la température optimale est de 37°C. Cependant elles sont, pour la majorité, capables de se multiplier à des températures allant de 5 à 47°C (Doyle, 1989; D'Aoust, 1994). Ces bactéries peuvent survivre à des pH compris entre 3,8 et 9,5 et à une activité de l'eau (a_w) comprise entre 0,94 et 0,99 bien que la valeur optimale soit 0,99. L'apparence des colonies après 24 heures sur milieux gélosés ordinaires est lisse, ronde, blanche et avec un bord régulier. Les principaux caractères biochimiques caractérisant le genre *Salmonella* sont répertoriés dans le tableau 16. Des variations souches dépendantes sont constatées sur les activités pour l'H₂S et le lactose.

Tableau 16 : Principaux caractères biochimiques permettant d'identifier le genre *Salmonella*
(Humbert et al., 1998)

Caractère biochimique	Activité
ONPG	-
Catalase	+
Citrate	+
Fermentation du glucose (production de gaz)	+
H₂S	+ (certaines souches -)
Indole	-
Lactose	- (certaines souches +)
Lysine décarboxylase (LDC)	+
Ornithine décarboxylase (ODC)	+
Oxydase	-
Phénylalanine désaminase (PDA)	-
Tryptophane désaminase (TDA)	-
Uréase	-

1.3. Pathogénicité et épidémiologie du genre *Salmonella*

Les bactéries du genre *Salmonella* peuvent être à l'origine des salmonelloses, ainsi que de la fièvre typhoïde et paratyphoïde chez l'Homme. Certains sérovars de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sont spécifiques à l'Homme (Typhi, Paratyphi A, B et C et Sendai) ou encore aux porcs (Choleraesuis). Cependant la majorité des sérovars sont ubiquistes et capables d'infecter plusieurs hôtes tels que les sérovars Typhimurium et Enteritidis.

Les sérovars à l'origine des fièvres typhoïde et paratyphoïde sont *S. enterica* subsp. *enterica* Typhi, Paratyphi A, B et C, et accessoirement Sendai associé à des cas sporadiques (Gal-Mor et al., 2014). Les autres sérovars, non typhoïdes, sont eux à l'origine des principaux syndromes gastroentériques d'origine bactérienne et caractérisés par une gastro-entérite aiguë chez l'Homme, autrement appelée salmonellose.

Salmonella sp. fait partie des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus fréquents, et est l'une des quatre causes principales de maladies diarrhéiques dans le monde (OMS, 2018). Les épidémies sont associées à des sérovars bien particuliers qui varient en fonction de la zone géographique.

D'un point de vue global, au niveau mondial, c'est le sérovar Typhimurium qui est le plus représenté. En Europe, il occupe la seconde position (EFSA and ECDC, 2019) des cas de

salmonellose chez l'Homme avec 40,2% des contaminations et aux Etats-Unis la troisième (CDC, 2016) tous types d'aliments et animaux confondus.

Aux Etats-Unis, 70% des cas de salmonellose sont attribués à la consommation de denrées alimentaires contaminées telles que les œufs et le poulet. Sur la période 2009-2015 (Dewey-Mattia et al., 2017), 2 953 épidémies sont survenues dont 23% (soit un total de 949 épidémies confirmées ou suspectées) étaient associées à *Salmonella*. Les sérovars ayant causé au moins cinq épidémies étaient Enteritidis (28 épidémies), Typhimurium (15), Newport (13), Heidelberg (7), Braenderup (6) et Javiana (6) (Dewey-Mattia et al., 2017).

En Europe, ce sont les sérovars Enteritidis, Typhimurium monophasique, Typhimurium, Infantis et Derby qui sont le plus retrouvés en 2018 dans les aliments et chez les animaux ainsi que parmi ceux ayant causé des cas humains (EFSA and ECDC, 2019). En effet, la salmonellose est une zoonose. De par le portage chez certains animaux, *Salmonella* peut être transmise à l'Homme par un cycle oro-fécal ou via l'alimentation. Environ 95% des cas humains sont ainsi dus à des contaminations via des denrées alimentaires contaminées pour les *Salmonella* non-typhiques (ANSES, 2011). En 2018, l'EFSA a dénombré 1 580 épidémies liées à la consommation de denrées contaminées par des salmonelles, entraînant 11 581 cas chez l'Homme. Comme en 2017, le sérovar prédominant dans ces épidémies était *S. Enteritidis* avec 49,9% des cas associés, suivi par Typhimurium ainsi que son variant monophasique.

En France en 2017, ce sont les sérovars Seftenberg et Montevideo qui étaient les plus présents dans le domaine de la santé et en production animale (ANSES, 2017). En 2018, 30 302 échantillons positifs à *Salmonella* ont été détectés chez les bovins (EFSA and ECDC, 2019). Une réelle baisse du nombre d'échantillons positifs est constatée puisqu'en 2017 ils étaient en seconde position avec 654 732 échantillons positifs. Si l'on regarde à l'échelle de la filière bovine en France, sur 1 042 souches collectées et appartenant à 29 sérovars, 29,3% appartenaient à *S. Dublin* (303). Viennent ensuite les sérovars Montevideo, Typhimurium, Mbandaka et Enteritidis, représentant à eux quatre 55,2% des souches. Peu d'informations sont disponibles sur les sérovars rencontrés spécifiquement en troupeaux laitiers néanmoins on sait que le sérovar Dublin représente une des causes majeures d'infection des troupeaux laitiers (Vignaud et al., 2017). Chez le porc, c'est le sérovar Typhimurium (22) qui est le plus retrouvé avec 40,7% des souches, suivi du variant monophasique de Typhimurium *S. 1,4,[5],12:i:-* (7), avec 13% des souches (ANSES, 2017).

Cette bactérie est retrouvée chez la plupart des animaux d'élevages, sauvages et domestiques tels que les volailles, les bovins, les chiens mais aussi les oiseaux et les reptiles. Pour les volailles et les porcs, le portage est majoritairement asymptomatique et les formes cliniques sont rares. Les

animaux porteurs sains, ne présentant donc aucun symptôme, rendent la détection plus difficile. Chez les bovins, des formes de salmonellose avec des symptômes caractéristiques comme chez l'Homme, à savoir des diarrhées pouvant être hémorragiques ainsi que de la fièvre, sont retrouvées. Des avortements peuvent être causés en plus des diarrhées, notamment par le sérovar Dublin (Poupée, 2016).

2. La filière laitière face aux *Salmonella*

2.1. Situation en Europe et en France

En Europe en 2018, les produits laitiers ont représenté 8,8% (44 078 échantillons) des échantillons alimentaires positifs à *Salmonella* liés à des cas humains de salmonellose (EFSA and ECDC, 2019). Entre 2010 et 2015, les sérovars les plus retrouvés dans le lait et les produits laitiers étaient *S. Brandenburg*, *Kendougou* et *Oranlenburg* avec respectivement 20, 15 et 15% parmi les 10 sérovars identifiés (Smajhel and Shadrova, 2019). Récemment l'augmentation du nombre de cas liés au sérovar Dublin dans l'industrie laitière a été observé en Europe (Holschbach and Peek, 2018).

Pour ce qui est de la situation en France, en 2017, la majorité des souches isolées d'échantillons de produits laitiers appartenait aux sérovars Dublin (38,4%), *Agona* (17,8%) et *Enteritidis* (12,7%) (ANSES, 2017). Concernant le lait cru c'est le sérovar Dublin qui était le plus largement représenté au niveau national avec 286 isollements, soit près de 39% des souches retrouvées (Figure 5). Dans les fromages, le sérovar prédominant était *Enteritidis*, avec 99 isolats, suivi par Dublin, avec 98 isolats. Dans les produits à base de lait, le sérovar *Reading* était majoritaire (188). Au vu de l'épidémie survenue dans les poudres de lait infantiles en 2017, c'est le sérovar *Agona* qui était prédominant (188) dans cette catégorie de produits. Ce résultat est spécifique à cette épidémie puisqu'en effet ce sérovar n'était présent qu'à hauteur de 1,5% en 2016 et 0,1% en 2015 dans les produits laitiers. D'une manière générale, les sérovars présents dans laits crus et fromages sont similaires.

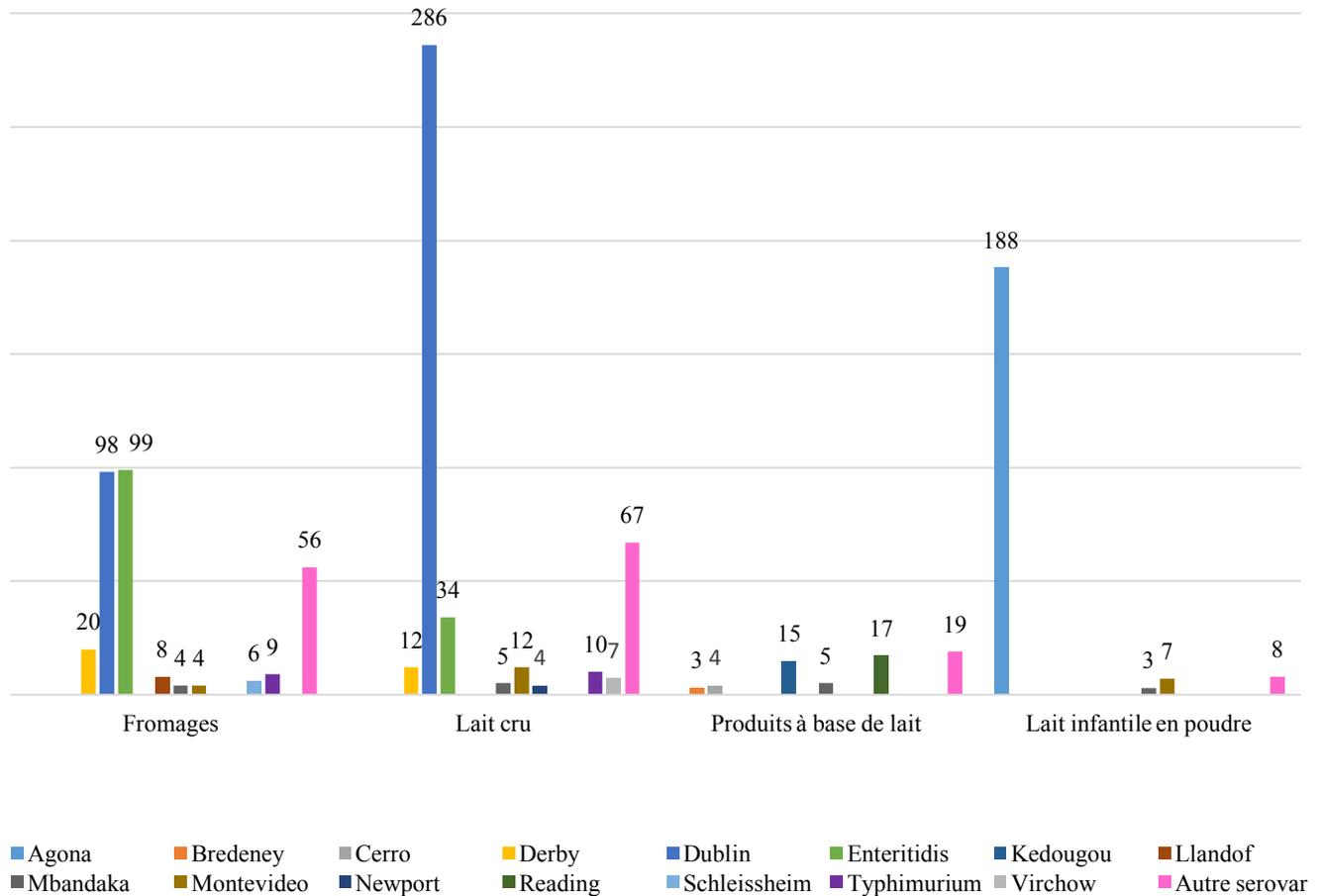


Figure 5: Répartition des sérovars isolés (en nombre de souches) dans les produits laitiers en 2017 en France (d’après ANSES, 2017)

2.2. Sérovars de *Salmonella* prédominants en Normandie

Une étude menée par l’ANSES en 2017 a permis de collecter 14 025 souches de *Salmonella*, dans les 13 régions de France, afin d’évaluer la prévalence des sérovars par région. Ces souches sont associées à trois secteurs de la chaîne agro-alimentaire : la santé et production animale, l’hygiène des aliments, et l’environnement. Le tableau 17 représente la répartition des sérovars pour la région Normandie, ainsi que quatre autres régions françaises représentatives, pour tous types d’échantillons confondus. Les sérovars prédominants de *Salmonella* retrouvés ne sont pas tous les mêmes dans chaque région (ANSES, 2017). En effet, pour certaines régions, un pourcentage très fort d’un certain sérovar peut être retrouvé, ce qui ne sera pas forcément le cas pour une autre région. Tous types d’échantillons confondus, les sérovars Mbandaka et Montevideo sont les plus retrouvés en Normandie.

Tableau 17 : Répartition de quelques sérovars de *Salmonella* retrouvés dans quatre régions de France éloignées (adapté de Anses, 2017)

Sérovar	Nombre d'isolats	Nombre d'isolats et pourcentage par rapport au sérovar				
		Auvergne-Rhône-Alpes	Bretagne	Centre-Val de Loire	Normandie	Occitanie
Dublin	723	57 (7,9)	4 (0,55)	0	5 (0,7)	1 (0,1)
Enteritidis	782	351 (44,9)	92 (11,8)	8 (1)	16 (2)	52 (6,6)
Mbandaka	462	3 (0,6)	119 (25,7)	1 (0,2)	195 (42,2)	6 (1,29)
Montevideo	1136	47 (4,1)	549 (48,3)	7 (0,6)	193 (16,9)	5 (0,4)
Seftenberg	2 211	79 (3,6)	730 (33)	32 (1,5)	17 (0,8)	81 (3,7)

Les sérovars représentés au niveau régional ne sont pas figés et leur abondance varie au cours du temps. Si l'on compare les sérovars retrouvés en Normandie en 2013 et en 2017 à l'aide des inventaires *Salmonella* d'origine non humaine, de fortes variations sont observées pour la région Normandie. En 2013, les trois sérovars prédominants étaient Give (soit 16,8%), suivi de Jerusalem (13,3%), et enfin Montevideo (11,6%). Si l'on compare avec les résultats de 2017, il ne reste plus qu'un seul isolat appartenant au sérovar Give, et aucun pour Jerusalem. Par contre une augmentation des sérovars Mbandaka, Montevideo et Typhimurium est observée.

Malgré des variations au cours du temps, le sérovar Mbandaka fait partie des sérovars retrouvés dans l'environnement laitier en Normandie depuis au moins 2005 (Lailler et al., 2005; ANSES, 2011). Ce constat a notamment été validé par une étude réalisée sur des fermes laitières issues de trois départements dont l'un en Normandie : l'Orne (Lailler et al., 2005). Cette étude a mis en évidence la présence de nombreux sérovars dont Mbandaka, Agona, Anatum, Infantis et S.III 21:k:z pour le département de l'Orne. Dans son étude, Poupée a mis en évidence la présence du sérovar Mbandaka en Normandie en 2016.

3. Contamination des laits crus par les *Salmonella*

3.1. Contamination du lait cru à la ferme

La contamination du lait cru par *Salmonella* s'effectue majoritairement à la ferme par les bovins. En effet les voies de contaminations par les *Salmonella* chez les bovins sont caractérisées par un cycle oro-fecal, elles sont nombreuses et souvent inter-reliées (Figure 6). *Salmonella enterica* est introduite dans le troupeau majoritairement via l'importation d'un animal malade, une nourriture

contaminée (Jones et al., 1982) ou par la présence d’animaux domestiques ou sauvages porteurs de la maladie (Medhanie et al., 2014; Stevenson et al., 2016; Elser et al., 2019)

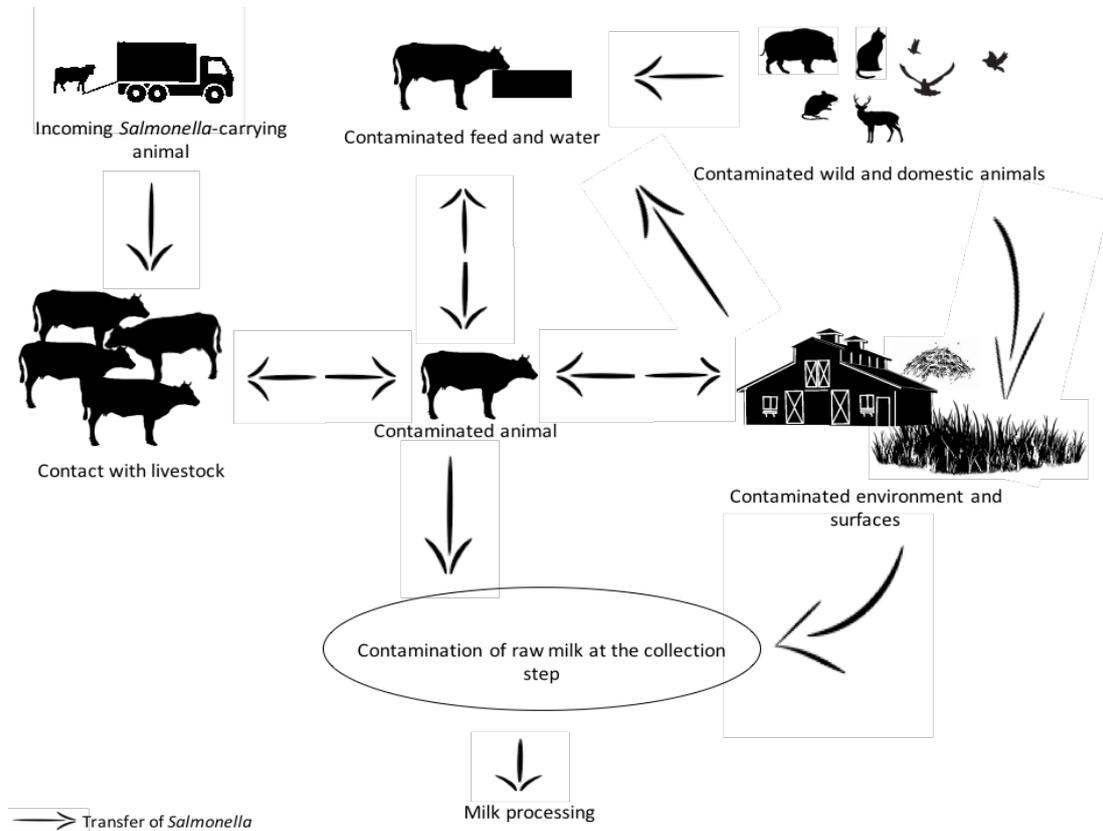


Figure 6 : Diffusion de *Salmonella* sp. à la ferme (adapté de Schlüsselhuber et al, submitted)

La première voie de contamination des bovins par *Salmonella* est la contamination inter-bovins (Corbion et al., 1995). Une contamination inter-bovins peut avoir lieu lors de l’importation d’un nouvel animal, qu’il soit malade ou porteur sain, dans le troupeau. L’animal infecté par *Salmonella* pourra transmettre au troupeau l’infection par transfert horizontal (entre bovins) ou par transfert vertical (de la vache au veau) (Hanson et al., 2016).

Les vaches porteuses peuvent héberger le pathogène dans les tissus lymphoïdes sans l’excréter sauf dans des conditions de stress (Gronstol et al., 1974). Elles peuvent également héberger *Salmonella* dans la lumière intestinale, dans les tissus intestinaux, dans le système lymphoïde et les organes internes, et l’excréter en grandes quantités (porteurs actifs) (Nielsen, 2013). Les infections aiguës durent de quelques jours à plusieurs semaines avec une possible propagation directe ou indirecte (via la litière) de la bactérie par les selles, l’urine et les écoulements vaginaux. Suite à une infection aiguë, une infection persistante peut survenir pendant des mois, voire des années. Dans ce

cas, l'infection peut devenir chronique (avec des signes cliniques), ou conduire à un état de porteur sains (aucun signe clinique) (McGuirk and Peek, 2003; Nielsen, 2013).

Dans le cas de contaminations inter-bovins, ce sont les déjections qui représentent le plus gros vecteur de *Salmonella* (Heuchel et al., 2000; Nielsen, 2013). En effet, les bovins excrètent entre 30 à 50 kg de bouses par animal et par jour. Un animal malade ayant des signes cliniques peut excréter environ 10^9 UFC/g de fèces par jour. Sachant que la dose infectieuse est comprise entre 10^9 et 10^{11} bactéries, ces déjections constituent donc une source non négligeable de contamination (McGuirk and Peek, 2003).

Une étude danoise a montré qu'entre 1 et 13% des vaches étaient des animaux porteurs sains (Nielsen et al., 2004). En effet, il apparaît que 5% des vaches apparemment en bonne santé seraient un vecteur d'excrétion (McGuirk and Peek, 2003). Tout comme les porteurs ayant des signes cliniques, l'excrétion d'un porteur asymptomatique peut être très importante et peut aller jusqu'à 10^{10} salmonelles par jour pour le sérovar Dublin (Martel, 1985).

Si les contaminations inter-bovins sont nombreuses et par l'intermédiaire des fèces, c'est notamment grâce à la persistance du genre *Salmonella*. Il fait partie des bactéries ayant une grande capacité d'adaptation et de survie dans différents environnements non optimaux pour leur croissance (Dandekar et al., 2012). Dans l'environnement laitier, et notamment à la ferme, ce genre bactérien peut persister de deux mois à quatre ans dans les bâtiments ayant pourtant été désinfectés préalablement (McLaren and Wray, 1991), et jusqu'à cinq ans dans le sol, l'eau et dans la nourriture (McGuirk and Peek, 2003). Les températures négatives, la réfrigération et l'assèchement ne permettent pas de détruire cette bactérie mais seulement de ralentir sa croissance (FDA, 1998). Le tableau 18 illustre la survie de *Salmonella* dans différents environnements. *Salmonella* peut survivre jusqu'à six ans dans les fèces sèches de bovins, représentant la source majeure de contamination.

Tableau 18 : Différents temps de survie de *Salmonella* dans plusieurs milieux (Camart-Périeré, 2006)

Source	Temps de survie
Fèces de bovins	> 6 mois
Fumier de bovins	> 7 mois
Fèces sèches de bovins	30 mois et > 6 ans (<i>Salmonella</i> Dublin)
Urine de bovins	< 5 jours
Pâturage	120 jours

L'environnement représente donc une source importante de contamination. Il existe plusieurs voies environnementales : la présence d'animaux sauvages ou domestiques, l'alimentation et l'eau (Schelcher and Valarcher, 1997).

En effet, les animaux sauvages, tels que les oiseaux, les rats et chats errants, peuvent être porteurs de *Salmonella* (Kirk et al., 2002). A la ferme, la présence de ces animaux peut entraîner une contamination directe des aliments, de l'eau et des litières via les déjections. Il a été mis en évidence que les rats représentaient le principal vecteur animal de *Salmonella*, dont plus de 22% qui seraient porteurs de la bactérie (Mesina and Campbell, 1975). Une autre étude, réalisée pendant 12 mois, a mis en évidence une contamination des bovins via les fèces d'oiseaux lorsque de la nourriture pour oiseaux était placée près de l'endroit de nourrissage des vaches (Medhanie et al., 2014). Certaines études tendent à montrer que la présence de ces animaux jouerait un rôle dans la persistance au niveau du troupeau (Tablante and Lane, 1989) et dans l'alimentation (Glickman et al., 1981; Evans and Davis, 1996). D'autres animaux présents à proximité des vaches peuvent être à l'origine d'une contamination, comme les moutons, les cochons, les chèvres et les chevaux (Gibson, 1965).

L'alimentation des bovins peut également être contaminée, et ce de plusieurs manières. Une contamination peut être retrouvée à différentes étapes du processus de fabrication, dont notamment au niveau des ingrédients de base (Davis et al., 2003). Dans ce cas figurent notamment les tourteaux de colza, régulièrement contaminés (Boloh, 1994). Si l'aliment arrive non contaminé à la ferme, il peut le devenir lors du stockage (contenants souillés d'un précédent lot de nourriture et nettoyage non efficace ou contamination par les animaux extérieurs).

L'eau peut également être contaminée en amont directement par une pollution externe ou par des déjections animales. Une étude menée en 1954 a mis en évidence une contamination d'eau de prairie, causée par une pollution humaine (Bederke and Lundt, 1954). Même si cela reste rare, quelques cas de contamination de rivières ou de fleuves peuvent se faire en amont par l'Homme. Une contamination de l'eau via les déjections, soit par des animaux présents dans le troupeau, soit par des animaux sauvages extérieurs, est majoritairement retrouvée.

La persistance de *Salmonella* dans l'environnement de la ferme peut également être favorisée par la présence d'amibes libres. En effet, ces organismes, habituellement présent dans des zones humides (flaques, rivières, mares, sol, ...), possèdent la capacité d'héberger d'autres micro-organismes, pathogènes ou non. Les amibes libres peuvent donc être des réservoirs et jouer un rôle dans la survie de ces pathogènes (Cateau et al., 2014). Il a été observé que *Salmonella enterica* était capable de survivre dans les amibes libres, lui conférant une protection ainsi qu'une survie plus

importante vis à vis des macrophages. Une étude a mis en évidence l'augmentation de la persistance de *S. Typhi* en présence de *Acanthamoeba castellanii* allant jusqu'à 3 semaines en comparaison avec la souche cultivée seule dans les mêmes conditions (Douesnard-Malo and Daigle, 2011). La croissance de l'amibe seule fut la même qu'en présence de *Salmonella Typhi*, suggérant l'absence d'effet délétère de la bactérie sur l'amibe.

Toutes ces sources de contaminations peuvent engendrer par la suite une contamination du lait cru, par l'intermédiaire des bovins. En effet la voie majoritaire de contamination du lait est en salle de traite. Dans ce cas elle peut s'effectuer de plusieurs manières. Elle peut s'effectuer par un défaut ponctuel de l'hygiène dans la salle de traite (Heuchel et al., 2000; Heuchel and Marly, 2003), lors d'un mauvais nettoyage des mamelles (Heuchel and Marly, 2003), par des éclaboussures de fèces contaminées (Buret, 1997; Ruzante et al., 2010), par une eau de traite préalablement contaminée (Heuchel et al., 2000), ainsi que par une non désinfection des lavettes lors d'un changement d'utilisateur.

Il existe également une autre voie de contamination par l'excrétion de *Salmonella* directement via les mamelles. Cette excrétion reste rare mais non sans conséquences puisque la quantité de *Salmonella* excrétée est très importante et la durée également (Heuchel et al., 2000). La période peut en effet s'étendre de plusieurs mois à des années et peut s'effectuer en continu ou par intermittence.

3.2. Colonisation et survie de *Salmonella* en milieu laitier

De par sa grande résistance à différentes conditions environnementales, ainsi que de par ses caractéristiques physiologiques et biochimiques, *Salmonella* est tout à fait capable de coloniser la matrice laitière. Dans cette partie les principaux constituants et caractéristiques physico-chimiques des laits seront considérés vis-à-vis de la croissance et/ou survie de *Salmonella*.

Dans la matrice laitière, les principaux points à prendre en compte sont le catabolisme des sucres et des acides organiques, la protéolyse (notamment l'hydrolyse de la caséine), l'utilisation d'acides aminés et d'azote non protéique, mais aussi les besoins en vitamines et minéraux.

Le lactose figure parmi les constituants majoritaires du lait. Si de manière générale *Salmonella* n'est pas capable de fermenter le lactose, il a été mis en évidence que certaines souches ont cette capacité (Le Minor et al., 1982; McDonough et al., 2000), notamment certaines souches de *S. Mbandaka*. Les souches consomment le D-glucose et le D-galactose, qui sont issus de l'hydrolyse du lactose, par les bactéries lactiques principalement (Tableau 19). Il est notamment intéressant de noter que l'acide lactique, très présent dans la matrice fromagère est utilisé comme source de carbone.

Bien que les caséines du lait aient été rapportées par certains auteurs comme non utilisables par *Salmonella* comme sources de carbone et d'azote, une étude a mis en évidence la capacité de *S. Typhimurium* à hydrolyser les caséines du lait (Kumar and Nandi, 2007). D'autres sources carbonées et azotées sont présentes et utilisables dans le lait. En effet la présence de nombreux acides dans le lait est constatée (acétique, butyrique, citrique...), que certains sérovars sont capables d'utiliser comme source de carbone (Tableau 19) avec une variabilité en fonction des sérovars. Une souche de *S. Typhimurium* est capable d'utiliser les acides caproïque, myristique et oléique du lait comme seule source de carbone (Iram and Cronan, 2006). La présence d'acides aminés dans la matrice laitière est également une source de carbone et/ou d'azote, comme mis en avant notamment pour des souches appartenant aux sérovars Typhi (Chai et al., 2012), Typhimurium (Gutnick et al., 1969), Mbandaka, Panama et Anatum. Les divers nucléotides et bases azotées du lait sont également utilisables par certaines souches de *Salmonella*. Parmi les sources non protéiques majeures présentes dans le lait, *Salmonella* n'est pas capable d'utiliser l'urée.

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance du fer pour la croissance de micro-organismes. Chez *Salmonella* cette importance a été mise en évidence dans une étude montrant une diminution importante de la croissance de *S. Typhimurium* lors de la réduction de la disponibilité en fer dans le milieu (Parmanand et al., 2019). Dans le lait, la concentration en fer est basse, avec entre 0,2 et 0,5 ppm, et dépend du stade de lactation ou encore de l'âge de l'animal (Courtet Leymarios, 2010). De plus, la concentration en fer libre Fe^{3+} est très faible, à cause la séquestration par la lactoferrine présente naturellement dans le lait. Si la concentration de zinc dans le lait (3000-6000 $\mu\text{g/mL}$) ne semble pas aussi limitante que les concentrations d'autres éléments tels que le fer, le manganèse, le sélénium, le cuivre ou encore le cobalt, cet élément pourrait représenter un facteur limitant pour la survie et la croissance de *S. enterica* dans un contexte de compétition microbienne (Courtet Leymarios, 2010).

Le lait contient également de très nombreuses vitamines. Si la plupart des souches de *Salmonella* n'ont pas de besoins particuliers en vitamines, certaines requièrent la présence d'acide nicotinique ou de sa forme amine, la thiamine (Suzuki and Sakaguchi, 1955). Cet élément est retrouvé dans le lait à des concentrations pouvant aller jusqu'à 0,42 mg/L (Courtet Leymarios, 2010).

Tableau 19 : Métabolisme du carbone et de l'azote de diverses souches de sérovars différents chez *Salmonella enterica*. Les sources retenues sont présentes dans le lait, ou les produits laitiers fermentés et non fermentés (Schlusselhuber et al, submitted)

Source	<i>Salmonella</i> Anatum, Mbandaka, Montevideo, Ohio, Panama ¹	<i>Salmonella</i> Typhi ²	<i>Salmonella</i> Typhimurium ³
Carbon source			
α -D-Lactose	-	n.d.	-
D-galactose	+	+	+
Acetic acid	+	v	+
Butyric acid	n.d.	n.d.	-
Citric acid	+	n.d.	+
Formic acid	-	n.d.	-
D-Lactic acid	n.d.	+	-
L-lactic acid	+	+	+
Myristic acid	n.d.	n.d.	+
Oleic acid	n.d.	n.d.	+
Propionic acid	+: <i>S. Anatum</i> , Montevideo, Panama v: <i>S. Mbandaka</i> -: <i>S. Ohio</i>	v	+
Carbon and/or nitrogen sources*			
Adenosine	n.d.	+	+ C, N
Casein	n.d.	n.d.	- C, N
Cytidine	n.d.	n.d.	+ C, N
Cytosine	n.d.	n.d.	+ N
2-deoxyadenosine	n.d.	+	+ C, N
2-deoxycytidine	n.d.	n.d.	+ C, N
2-deoxyguanosine	n.d.	n.d.	+ C
2-deoxyuridine	n.d.	n.d.	+ C
Gelatin	-	n.d.	- C, N
Guanosine	n.d.	n.d.	+ C
Inosine	+	+	+ C
L-Aspartic acid	+	n.d.	+ N
L-Glutamic acid	+	v	+ N
Isoleucine	n.d.	n.d.	- C, N
Leucine	n.d.	n.d.	- C, N
Lysine	n.d.	n.d.	- C, N
L-Proline	n.d.	v	+ C, N
L-Serine	+	+	+ C, N
Thymidine	n.d.	+	+ C
Uridine	n.d.	+	+ C
Valine	n.d.	n.d.	- C, N
Urea	n.d.	n.d.	- C, N

¹authors' personal data from one strain of *S. Anatum*, 6 strains of *S. Mandaka*, 4 strains of *S. Montevideo*, 2 strains of *S. Ohio*, and 3 strains of *S. Panama* isolated from cattle environment

²(Chai et al., 2012) from 8 strains, amino acids and nucleosides tested as carbon sources

³(Gutnick et al., 1969) from *S. Typhimurium* LT-2, amino acids tested as carbon and nitrogen source

n.d. = not determined

v= variable among strains

*tested as carbon (C) or nitrogen (N) source for *S. Typhimurium*, as carbon source only for other serovars

De nombreux constituants du lait peuvent permettre la croissance de *Salmonella*. En plus de sa composition, les caractéristiques physico-chimiques de la matrice laitière sont favorables à la croissance de *Salmonella*.

En effet, les souches de *Salmonella enterica* sont capables de croître à des températures allant de 2 à 54° C pour certaines souches (les valeurs classiquement rencontrées sont comprises entre 5 et 50°C), avec une plage optimale de 30°C à 37°C (Li et al., 2014). Cette capacité de croissance à une plage de température aussi vaste permet la survie, et potentiellement la croissance, tout au long de la chaîne alimentaire laitière (du stockage du lait à la cuisson du caillé pour les fromages à pâte dure). En plus des températures rencontrées lors du processus de fabrication, la variation de pH de la matrice laitière est également un facteur physico-chimique important.

Le pH de croissance optimal des souches de *S. enterica* se situe entre 6,5 et 7 et couvre donc le pH du lait frais (pH 6,8). La capacité de certaines souches à croître à des pH beaucoup plus acides (pH 4,5) et alcalins (pH 9,5) permet d'assurer leur croissance tout au long de la transformation du fromage. Malgré de fortes variations de température et de pH au cours du processus de fabrication, *Salmonella* semble être une bactérie adaptée pour la croissance dans cette matière. Ce genre est également capable de croître à des concentrations de NaCl allant jusqu'à 5%, en particulier dans des conditions anaérobies qui protègent les bactéries contre les effets létaux du NaCl (Thayer et al., 1987). Il pourrait donc survivre et croître au cœur de nombreux fromages, dont la concentration en sel varie d'environ 0,7 à 6% (Guinee and Fox, 1993)

Toutes ces études mettent en évidence la robustesse et la capacité d'adaptation de *Salmonella* à une matrice aussi complexe que le lait et le fromage. De plus, elle est également capable de survivre durant le processus de fabrication du fromage, passant d'une matrice liquide à solide mais également à des conditions de pH et de températures très variables.

3.3. Prévention de *Salmonella* en filières au lait cru

3.3.1. La prophylaxie sanitaire et autres méthodes préventives à la ferme

Une des premières mesures et outil de bon sens mis en œuvre à la ferme pour lutter contre la dissémination de *Salmonella* est la prophylaxie sanitaire. Que ce soit pour lutter contre *Salmonella* ou d'autres pathogènes, l'hygiène en environnement laitier reste primordiale. Face à la recrudescence de cas de salmonellose dans les élevages laitiers, plusieurs recommandations ont été mises en place afin de diminuer le potentiel d'excrétion à la ferme, telles que :

- La séparation des différents élevages (porcs, moutons, bovins, etc ...) dans une même exploitation.

INTRODUCTION – Les *Salmonella* en environnement laitier

- La séparation des veaux sevrés, beaucoup plus sensibles, afin d'éviter les risques de contamination (Martel, 1985).
- L'installation de pédiluves. Une étude a mis en évidence que des élevages dépourvus de ce système étaient trois fois plus contaminés en *Salmonella* que les fermes possédant ce dispositif (Davison et al., 2006).
- Une conception et une hygiène appropriées des bâtiments. L'absence d'un vide sanitaire ou encore une humidité des litières représentent un important facteur de risque (Heuchel et al., 2000).
- Une vérification de l'eau potable de la ferme, des rivières et des mares présentes dans le pâturage.
- Un nettoyage régulier des abreuvoirs et des endroits de stockage de l'alimentation.
- Un contrôle de la présence d'animaux extérieurs dans l'enceinte d'élevage.
- Un respect des consignes concernant le lisier et le temps d'attente pour l'épandage.

La prévention de la contamination du lait repose principalement sur des mesures d'hygiène rigoureuses en salle de traite. Cependant la mise en place de toutes ces mesures représente énormément de temps pour les éleveurs, qui n'effectuent pas toujours toutes ces précautions d'hygiènes régulièrement et durablement.

D'autres méthodes préventives peuvent également être mises en place. La vaccination fait partie de ces solutions. Le seul vaccin disponible en France actuellement est le Salmoplast®. Ce vaccin inactivé a été établi à partir deux sérovars de l'espèce *S. enterica* : Dublin et Typhimurium. Il permet de conférer une certaine immunité contre la maladie, réduisant la mortalité, mais ne protège pas contre l'infection à *Salmonella* (House et al., 2001). Dans la thèse de Poupée (2016), il a été mis en évidence une baisse non significative de l'excrétion de *Salmonella* au sein du troupeau et une baisse de l'excrétion individuelle après vaccination. Cette baisse d'excrétion non significative au sein du troupeau pourrait être expliquée par le fait que les sérovars retrouvés n'appartiennent pas à ceux ciblés initialement par le vaccin. Dans une autre étude, même si ce vaccin ne confère pas de solution réelle au problème, il permet de réduire l'excrétion au sein de l'environnement et donc par conséquence de réduire le nombre d'animaux contaminés (Desjouis et al., 1997). La vaccination des vaches gestantes et des mères permettrait de diminuer le risque de transmission au veau, plus sensible au pathogène durant les premières semaines suivant la naissance (Brewer et al., 2014).

L'utilisation des vaccins reste une solution de courte durée. Si cette alternative est mise en place, elle doit être suivie de manière rigoureuse et notamment sur les différents rappels de vaccination à effectuer. En effet, si cela n'est pas respecté, l'excrétion de *Salmonella* dans

l'environnement reprendra aussitôt chez un animal contaminé.

L'ajout de probiotiques et de dérivés dans la ration alimentaire des bovins est également une alternative. Le tableau 20 recense l'ensemble des différentes études menées sur différents animaux, dont les bovins, avec l'utilisation de probiotiques à base de souches de *Lactobacillus* de différentes espèces. Ces probiotiques sont administrés via l'alimentation suivant une période de temps variant d'un probiotique à l'autre. L'efficacité de ceux-ci dépend de la souche utilisée. Cette solution reste très spécifique, puisque l'action des probiotiques est restreinte à une espèce, voire à un sérovar particulier. Dans son étude, Poupée a observé une baisse significative de l'excrétion individuelle, liée à l'apport de pré et pro-probiotiques. Cependant, celle-ci n'est pas en corrélation avec une baisse significative de l'excrétion d'une manière générale. En effet, malgré la baisse de l'excrétion individuelle, trois élevages présentaient une augmentation du taux d'excrétion.

Tableau 20 : Utilisation de probiotiques à la ferme et effets observés face à *Salmonella* (d'après Poupée, 2016)

Probiotiques	Concentration	Effets observés	Durée alimentation	Salmonelle testée	Espèces animales hôtes	Sources
<i>L. casei</i>	10 ⁶ (avant et après challenge à <i>Salmonella</i>)	Diminution des signes cliniques et diarrhée et de la charge intestinale en <i>Salmonella</i>	6 à 9 jours	<i>S. Typhimurium</i> DT104	Cochon	(Yin et al., 2014)
<i>L. zeae</i>		Diminution de l'inflammation locale et générale et de la dissémination bactérienne dans l'organisme			Taurillons	
<i>L. acidophilus</i> 51 et <i>P. freudenreichii</i> 24	10 ⁹ UFC/g d'aliments Absence de challenge	Diminution de l'incidence d'excréteur	84 jours	<i>Salmonella</i> sp.	Taurillons	(Tabe et al., 2008)
<i>L. acidophilus</i> NP 51	10 ⁹ UFC par taurillon	Diminution de 48% de l'excrétion des salmonelles	137 jours		Taurillons	(Stephens et al., 2007)
<i>L. casei</i> CRL 431	10 ⁸ UFC/mL (avant et après challenge à <i>Salmonella</i>)	Diminution de la réponse inflammatoire locale et augmentation de la fonction de la barrière intestinale	14 à 17 jours	<i>S. Typhimurium</i>	Souris	(Castillo et al., 2013)

Les sous-produits, ou dérivés de probiotiques, peuvent également être utilisés. Une étude a été menée afin de déterminer l'impact d'une combinaison de deux sous-produits de *Saccharomyces cerevisiae* (Diamond V™, SmartCare™ et Diamond V Original XPC™) sur les veaux infectés par *Salmonella* Typhimurium (Brewer et al., 2014). Il a été mis en évidence qu'avec une alimentation contenant ces dérivés de probiotiques, la colonisation intestinale, les diarrhées et la fièvre avaient été réduites de manière significative. En parallèle de cela, d'autres aspects économiques intéressants sont ressortis, puisque cette alimentation a aussi montré une prise de poids plus efficace, ainsi qu'une augmentation de la production laitière grâce à une stabilisation du pH dans le rumen.

3.3.2. Mesures barrières lors de la transformation

Lors de la contamination par des pathogènes tels que *Salmonella* dans une matrice, certaines mesures peuvent être mises en place pour son élimination. Dans le lait, l'application de traitement thermique (pasteurisation, thermisation) est l'alternative la plus connue. D'autres traitements tels que la lumière ultraviolette (Crook et al., 2015), la lumière bleue (Dos Anjos et al., 2020), la microfiltration (Madec et al., 1992), ou les hautes pressions dynamiques (Vachon et al., 2002) se sont révélés efficaces pour l'élimination de *Salmonella*. Cependant aucune de ces mesures n'est applicable en filière AOP au lait cru. La seule mesure qui pourrait être mise en place pour le contrôle de *Salmonella* dans cette filière est l'utilisation d'agents bioprotecteurs.

CHAPITRE III : La bioprotection

1. Généralités sur la bioprotection

On estime à 1,3 milliards de tonnes la nourriture jetée, ou impropre à la consommation, chaque année dans le monde (FAO, 2012). Dans les matrices alimentaires potentiellement plus sensibles à l'implantation de micro-organismes pathogènes ou d'altération, de nouvelles solutions se développent, afin de garantir une sécurité alimentaire pour le consommateur et d'allonger la durée de vie des produits. En effet, l'absence de traitements tels que la pasteurisation ou la stérilisation, l'absence d'utilisation de conservateurs chimiques, ou les caractéristiques physico-chimiques de ces matrices, augmentent le risque d'implantation de micro-organismes pathogènes et/ou d'altération. La contamination par ces types de flores représente un élément majeur dans la perte de denrées alimentaires au niveau mondial.

Une de ces solutions consiste en l'utilisation de micro-organismes en tant que technologie de barrière (Leistner, 2000). En effet, certains micro-organismes naturellement présents dans un produit ou ayant été ajoutés en tant qu'agent technologique, peuvent avoir un effet barrière, afin de lutter contre l'implantation de ces flores indésirables. Cet effet barrière a été appelé la bioprotection. Ce concept fut défini en 1996 par Stiles comme étant la prolongation de la durée de vie et une augmentation de la qualité sanitaire des aliments, grâce à l'utilisation de la microflore naturelle et/ou des composés antimicrobiens produits (Stiles, 1996).

L'approche de bioprotection est de plus en plus étudiée, de par le contexte de sécurité sanitaire très présent, mais également la tendance des aliments sans « additif », sains, durables et aussi un désir de limiter au maximum le gaspillage alimentaire. La notion de « clean label » est retrouvée, reposant sur des principes clés : réduire les allergènes et additifs, réduire le nombre d'ingrédients utilisés, remplacer des ingrédients artificiels par des produits naturels et utiliser des termes clairs sur l'étiquetage pour rassurer le consommateur.

D'un point de vue scientifique, une réelle augmentation du nombre d'études associées à la bioprotection des matrices alimentaires peut être constatée. En 1995, il n'y avait que 5 articles associées à cette thématique (« biopreservation food », Pubmed), contre 89 articles en 2019. A l'heure actuelle, la bioprotection représente un axe majeur de la recherche pour améliorer les produits alimentaires sous plusieurs aspects (temps de vie des aliments, aliments plus « naturels » en composition et protections face aux pathogènes).

Pour certains micro-organismes, leur utilisation dans les denrées alimentaires est reconnue par la FDA (Food and Drug Administration) avec le statut GRAS (Generally Recognize As Safe) ou par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments). Le statut QPS (Qualified Presumption of

Safety) utilisé par l'EFSA, contrairement au statut GRAS, ne permet pas d'être déterminant dans le cadre de l'utilisation en alimentation humaine. Il est donc possible d'utiliser des ferments ne possédant pas ce statut.

Bien que très documentée sur les bactéries, l'action des microorganismes bioprotecteurs cible également la flore fongique. La revue de Leyva Salas (2017) illustre de manière complète les agents bioprotecteurs ayant une activité antifongique. On y retrouve en grande majorité les bactéries lactiques mais également d'autres groupes bactériens non lactiques tels que les *Actinobacteria*, les *Bacillus* ou encore certaines levures. On retrouve également des composés issus de la fermentation de bactéries lactiques qui ont été mis en évidence pour une activité antifongique, grâce à une méthode de criblage haut-débit en microplaque (Garnier et al., 2018; Garnier et al., 2020).

2. Les bactéries lactiques en tant qu'agents bioprotecteurs

2.1. Généralités sur les bactéries lactiques

La famille des bactéries lactiques a été décrite au début du XXème siècle (Orla-Jensen, 1919). Elle désignait des bactéries ayant la capacité d'acidifier le lait grâce à la production d'acide lactique. Le tableau 21 décrit la classification actuelle des bactéries lactiques.

Tableau 21 : Classification de la famille des bactéries lactiques (Liu et al., 2014; Zheng et al., 2020)

Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Lactobacillaceae</i>
Principaux genres retrouvés	<i>Aerococcus</i> , <i>Alkalibacterium</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Eggerthia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Halolactibacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Olsenella</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Sporolactibacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Tessaracoccus</i> , <i>Tetragenococcus</i> , <i>Trichococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , et <i>Weissella</i> ainsi que les 23 nouveaux genres issus de l'éclatement du genre <i>Lactobacillus</i> : <i>Acetilactobacillus</i> , <i>Agrilactobacillus</i> , <i>Amylolactobacillus</i> , <i>Apilactobacillus</i> , <i>Bombilactobacillus</i> , <i>Companilactobacillus</i> , <i>Dellaglioia</i> , <i>Furfurilactobacillus</i> , <i>Fructilactobacillus</i> , <i>Holzapfelia</i> , <i>Lacticaseibacillus</i> , <i>Latilactobacillus</i> , <i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Lapidilactobacillus</i> , <i>Lentilactobacillus</i> , <i>Levilactobacillus</i> , <i>Limosilactobacillus</i> , <i>Ligilactobacillus</i> , <i>Liquorilactobacillus</i> , <i>Loigolactobacillus</i> , <i>Paucilactobacillus</i> , <i>Secundilactobacillus</i> et <i>Schleiferilactobacillus</i>

Ce sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes, non mobiles, souvent aérotolérantes, en forme de bâtonnets ou de coques et ayant un faible pourcentage en GC dans leur génome (Holzapfel and Wood, 1995). Elles sont notamment décrites pour leur fort potentiel d'inhibition. Le spectre d'activité des bactéries lactiques est assez large puisqu'elles peuvent inhiber aussi bien des levures, des moisissures, que des bactéries à Gram positif et négatif (Stiles, 1996). Dans cette partie nous nous concentrerons sur leurs activités envers les bactéries à Gram négatif, dont notamment *Salmonella*, objet de cette étude.

2.2. Activité anti-*Salmonella* des bactéries lactiques *in vitro*

La mise en évidence de phénomènes d'antagonisme dans des milieux classiques de laboratoire est bien décrite. Le tableau 22 présente une liste non exhaustive de bactéries lactiques capables d'inhiber différentes souches de *Salmonella* en milieux *in vitro*. Une très grande proportion du genre *Lactobacillus*, bien décrit pour son activité inhibitrice en modèle et milieux classiques, est retrouvée.

Tableau 22 : Liste non exhaustive de bactéries lactiques inhibitrices de *Salmonella in vitro*

Espèce	Souche ciblée	Milieu	Référence
<i>E. faecium</i> 128, <i>E. faecium</i> 131, <i>P. parvulus</i> CE11_2	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i>	MRS TSA	(Yang et al., 2018)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	<i>S. Typhimurium</i> SL1344	MRS	(Keersmaecker et al., 2006)
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb.</i> <i>helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb.</i> <i>fermentum</i>	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	LB	(Zhang et al., 2016)
<i>Lb. johnsonii</i> LJ202	<i>S. Enteritidis</i> DMST710	MRS	(Abhisingha et al., 2017)
<i>Lb. helveticus</i> KLDS 1.8701	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	BHI	(Bian et al., 2016)
<i>Lb. amylovorus</i> C94 <i>Lb. salivarius</i> C86	<i>Salmonella</i> sp.	MRS	(Adetoye et al., 2018)
<i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>S. Typhimurium</i> <i>S. Enteritidis</i>	MRS	(Lin et al., 2020)
<i>Lb. reuteri</i> <i>P. pentosaceus</i> MP12, 22 et 36	<i>S. Dublin</i>		
<i>Lb. plantarum</i> LAP6 <i>Lc. mesenteroides</i> BCRC 121910	<i>S. Typhimurium</i> I50	LB	(Chiu et al., 2008)
<i>Lb. acidophilus</i> IBB 801	<i>S. Panama</i> 1467 <i>S. Typhimurium</i> SL1344	MRS TSA	(Zamfir et al., 1999) (Makras et al., 2006)
<i>Lb. amylovorus</i> DCE 471 <i>Lb. casei</i> Shirota YIT9029 <i>Lb. johnsonii</i> La1	<i>S. Typhimurium</i> SL1344	TSA	(Makras et al., 2006)
<i>Lb. plantarum</i> ACA-DC 287 <i>Lb. rhamnosus</i> GG			
<i>Lb. plantarum</i> ACA-DC287	<i>S. Typhimurium</i> SL1344	MRS	(Fayol- Messaoudi et al., 2007)

E. : *Enterococcus*, *Lb.* : *Lactobacillus*, *Lc.* : *Leuconostoc*, *P.* : *Pediococcus*, *S.* : *Salmonella*

2.3. Activité anti-*Salmonella* des bactéries lactiques en matrice laitière

Si de nombreuses activités des bactéries lactiques sont retrouvés sur des milieux classiques un potentiel inhibiteur est également observé en matrice laitière.

Une étude réalisée en matrice lait a révélé l'antagonisme d'une souche de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* envers deux bactéries à Gram négatif potentiellement pathogènes : *Salmonella* Enteritidis 949575 et *Escherichia coli* 3339 (Mufandaedza et al., 2006). Dans le cas de cette étude, l'activité antagoniste de la souche seule s'est révélée plus importante qu'avec une combinaison comprenant une levure. Dans une autre étude, le potentiel de croissance de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* en matrice lait au cours d'une fermentation fut évalué (Ashenafi, 1993). La présence de bactéries lactiques diminuait fortement la croissance avec une inhibition complète des deux souches de *Salmonella* entre 48 et 60 heures de croissance. Cette inhibition résultait d'une synergie entre la diminution du pH provoquée par les bactéries lactiques et la synthèse d'acides organiques.

Dans le cas du lait cru, la flore naturelle composée de bactéries lactiques peut avoir des propriétés bioprotectrices. Les différents genres de la flore lactique de lait cru provenant du Brésil furent testés pour leurs activités contre *Salmonella* spp. (Nero et al., 2008). L'espèce *Lactococcus lactis* était ici encore une fois la plus inhibitrice avec 11 isolats actifs (64%) contre *Salmonella* sp. (inhibition partielle).

En lait fermenté la souche de *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 inhibait une souche de *Salmonella enterica* grâce à la production de réutéline (Ortiz-Rivera et al., 2017). L'action antagoniste est très souvent liée à une synergie entre la baisse du pH et la synthèse de composés inhibiteurs.

Du fromage de chèvreensemencé avec des souches de *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus brevis* a montré une inhibition de la croissance de *Salmonella* Typhi par rapport au témoin nonensemencé (Ferrari et al., 2016).

Bien que le passage à des matrices telles que le lait ou le fromage entraîne souvent la perte de l'activité observée en milieux *in vitro*, certains micro-organismes présents sous formes d'associations ou seuls peuvent conserver cette activité inhibitrice. Le tableau 23 présente quelques exemples de communautés ou souches inhibitrices en matrice laitière. Ici, la présence d'associations dans un produit laitier (par exemple ici le yaourt) permettait d'obtenir une activité inhibitrice contre *Salmonella enterica*. Parmi les communautés retrouvées, le genre *Lactobacillus*, en association avec d'autres genres tels que *Leuconostoc* et *Streptococcus* et également des associations du genre *Lactococcus* avec différentes espèces.

Tableau 23 : Exemples de communautés microbiennes inhibitrices de *Salmonella* en matrice laitière
(Schlusselhuber et al, to be submitted)

Espèce	Origine	Cible	Mécanisme	Références
<i>Lb. paracasei</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Lc. mesenteroides</i>	Yaourt commercialisé	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 et ATCC 14028	Inconnu / pH	(Perea Vélez et al., 2007)
<i>Lb. plantarum</i> AA135	Yaourt égyptien home-made	<i>S. Paratyphi</i> R46, <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311 et d'autres bactéries Gram négatif et positif	Similaire à une bactériocine (plantaricine AA135)	(Abo-Amer, 2007)
<i>P. acidilactici</i> QC38	Fromage Cotija	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Similaire à une bactériocine entre 3,4 et 6,5 kDa (pediocin PA-1)	(Morales-Estrada et al., 2016)
<i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. plantarum</i>	Fromage de brebis au lait cru artisanal (Pecorino del Poro)	<i>S. sp</i> 1023 et <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O26 et O157:H7	Bactériocin-like compound	(Geria et al., 2014)
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. paracasei</i>	Lait cru Bangladais	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13098	Bactériocine, acides organiques et molécules de poids moléculaire faible	(Reuben et al., 2020)
<i>L. lactis</i> <i>L. chungangensis</i>	Environnement laitiers, lait cru et produits laitiers	<i>S. Mbandaka</i> UCMA 20269 ^{lux+} (souches luminescente)	Compétition nutritionnelle pour des oligo-éléments, vitamines ou acides aminés	Authors personal data
Communautés microbienne complexe	Surface de fromages	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	Inconnu	(Imran et al., 2010)
Surnageants d'une communauté microbienne	Fromages	Bactéries à Gram positif et négatif incluant <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Composé de petite taille et stable (pas bactériocine)	(Bleicher et al., 2010)

Lc. : *Leuconostoc*, *Lb.* : *Lactobacillus*, *L.* : *Lactococcus*

3. Mécanismes d'action des bactéries lactiques

Les mécanismes d'action des micro-organismes reposent sur plusieurs activités allant des interactions directes entre cellules, à la production de composés (antibiose et amensalisme), ou encore à la compétition (Figure 7). L'antagonisme est défini comme une interaction biologique entre plusieurs partenaires (de même espèce ou d'espèces différentes) dans laquelle l'interaction se révèle négative (en termes de valeur sélective) pour l'un des partenaires alors qu'elle est neutre pour l'autre partenaire. Nous nous intéresserons ici aux deux dernières catégories.

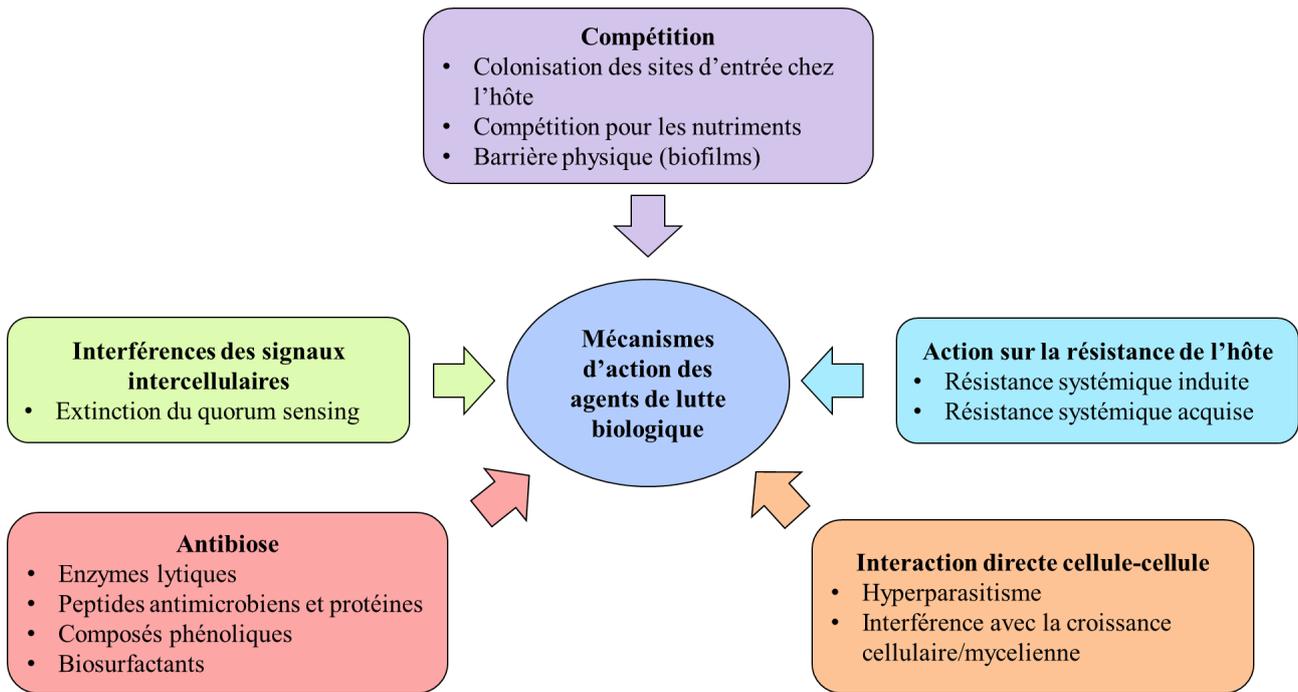


Figure 7 : Principaux mécanismes d'action des microorganismes d'après (Montesinos and Bonaterra, 2009)

La compétition peut se faire par interférence ou par exploitation. La compétition par interférence intervient quand un micro-organisme a une influence négative directe sur un autre micro-organisme en réduisant la capacité de l'autre à exploiter une ressource commune dont la concentration n'est pas limitante (Park, 1954; Vance, 1984). La compétition par exploitation, elle, est définie comme étant une forme de compétition où les micro-organismes ont un effet négatif les uns sur les autres en consommant une ressource qui leur est commune (Vance, 1984; Begon et al., 2009). C'est une compétition indirecte qui nécessite que la ou les ressources en question soient présentes en concentration limitantes. On y retrouve notamment la compétition nutritionnelle (Begon et al., 2009) sur laquelle nous nous focaliserons.

Cette compétition nutritionnelle est caractérisée comme étant « la consommation ou le contrôle de l'accès à une ressource comme les nutriments, l'espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée » (Widden, 1994).

L'antibiose elle, est caractérisée comme étant une « inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (Pal and McSpadden Gardener, 2006). Cependant certains auteurs différencient la production de composés entre antibiose et amensalisme. L'antibiose étant ici considérée comme la production de composés dont l'objectif principal est d'inhiber un autre micro-organisme (ex : bactériocine), à contrario de l'amensalisme définissant l'inhibition d'un microorganisme par un produit du métabolisme (ex : acide lactique). Nous avons ici choisi de nous

placer de ce point de vue.

La nature des composés produits par amensalisme et/ou antibiose est variée, que ce soit des enzymes, des peptides ou encore des acides, aldéhydes ou autres composés. Ils peuvent être retrouvés sous forme de composés volatils ou non.

3.1. Composés inhibiteurs produits par les bactéries lactiques

L'ensemble des composés à effet antimicrobien synthétisés par les bactéries lactiques sont représentés sur la figure 8, qui souligne une grande diversité de composés avec des acides organiques, du CO₂, des métabolites primaires et secondaires. Ces composés peuvent agir de manière additive voire synergique et sont produits à des concentrations variables en fonction de la matrice et des conditions de croissance.

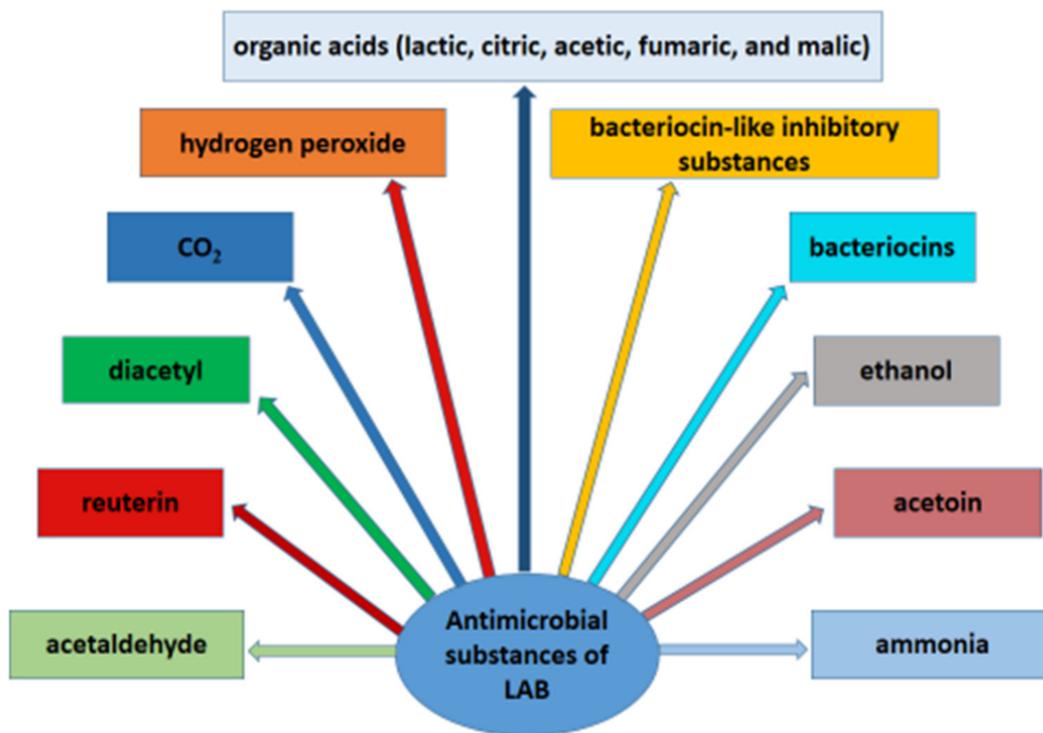


Figure 8 : Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques (Agriopoulou et al., 2020)

3.1.1. Les acides organiques

Les principaux métabolites synthétisés par les bactéries et ayant un effet antibactérien sont les acides organiques. Ces acides ont la capacité d'inhiber une large gamme des micro-organismes tels que les levures, les moisissures ainsi que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les acides organiques peuvent être présents sous deux formes. La forme non dissociée qui prédomine à pH <

pKa est caractérisée par une diffusion passive à travers la membrane, puis à une dissociation dans le cytoplasme. Elle entraîne ensuite une destruction du gradient électrochimique des protons et une inhibition des voies métaboliques par la forme anionique qui interagit avec les protéines (Gould, 1996; Brul and Coote, 1999).

Dans le cas de la forme dissociée (qui prédomine à $\text{pH} > \text{pKa}$), il y aura une entrée des protons dans la cellule par gradient de concentration, une baisse du pH intracellulaire entraînant des perturbations du flux métabolique, une fragmentation de l'ADN, une oxydation des lipides ainsi qu'une augmentation des charges positives des protéines entraînant une altération de leur fonction (Helander et al., 1997).

Parmi les acides organiques produits par les bactéries lactiques figure l'acide lactique, issu de la fermentation du lactose par les bactéries lactiques. C'est le seul acide issu de la glycolyse par la voie fermentaire. C'est un mono-acide ayant un pKa assez faible de 3,86 (Perrin et al., 1981). Il est connu pour ses propriétés anti-microbiennes et son spectre d'action très large. L'acide acétique lui, peut être issu du lactose par la voie hétérofermentaire et/ou de la fermentation du citrate, et possède un pKa de 4,75.

3.1.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est bien connu pour ses propriétés inhibitrices et certaines souches de bactéries lactiques sont capables de le synthétiser. Parmi les genres bactériens synthétisant ce composé l'espèce *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* est retrouvée avec des concentrations de production comprises entre 0,42 et 0,43 $\mu\text{g/mL}$ (Villegas and Gilliland, 1998). Une autre étude a mis en évidence la production de peroxyde d'hydrogène par de nombreuses souches de *Lactococcus lactis* avec, pour les plus performantes, une synthèse allant jusqu'à 350 $\mu\text{g/mL}$ (Ito et al., 2003). Chez les bactéries, son mécanisme d'action est basé sur l'oxydation des groupes sulfhydriles et des doubles liaisons des enzymes bactériennes, entraînant une perte de leur fonction, et par conséquent, la mort cellulaire.

3.1.3. Le diacétyl

Le diacétyl est notamment connu pour avoir un effet antagoniste sur les genres *Salmonella*, *Listeria*, *Yersinia*, *Aeromonas* et *Escherichia*. Certaines souches des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ainsi que *Pediococcus* sont capables de le produire par fermentation du citrate (Ross et al., 2002; Magnusson et al., 2003; Karimi et al., 2012).

3.1.4. La réutérine

La réutérine, toxique à forte concentration pour l'Homme, peut être produite par l'espèce *Lactobacillus reuteri* lorsque le glycérol est utilisé comme source de carbone. Elle possède une activité antagoniste envers des bactéries à Gram positif (*Listeria* et *Staphylococcus*) et négatif (*Salmonella* et *Shigella*) (Axelsson et al., 1989). Les concentrations produites par le genre *Lactobacillus* peuvent être comprises entre 0,87 et 58 µg/mL (Rodríguez et al., 2003). Son mécanisme d'action est basé sur l'inhibition de la synthèse des nucléotides (Axelsson et al., 1989).

3.1.5. Les bactériocines des bactéries lactiques

Elles sont caractérisées comme étant des peptides antimicrobiens produits par synthèse ribosomale avec ou sans modifications post-traductionnelles. Bien que leur activité puisse être fortement inhibitrice, leur spectre d'action est quant à lui généralement réduit à un genre voire une espèce bactérienne phylogénétiquement proche. Elles sont divisées en trois classes : les bactériocines de classe I, classe II, classe III (Figure 9) mais certains auteurs incluent une quatrième classe.

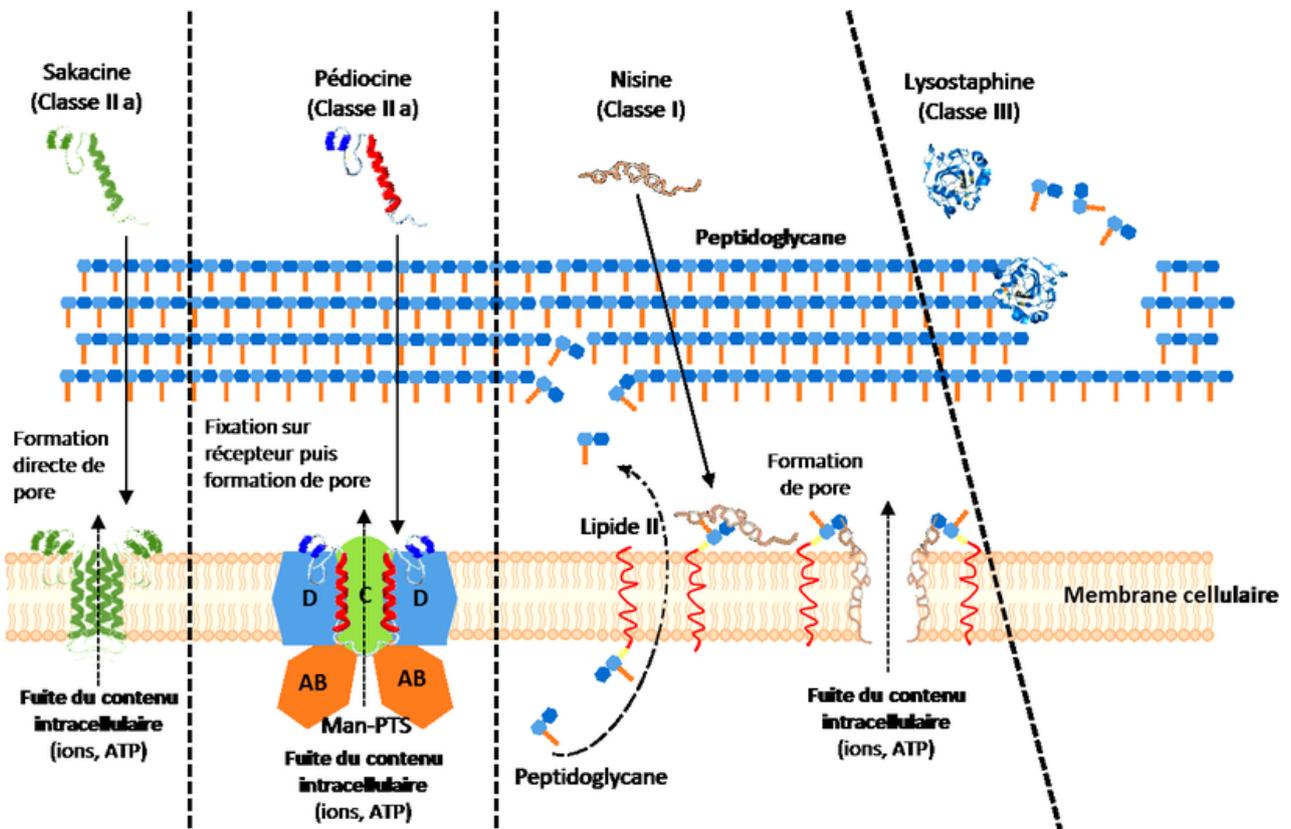


Figure 9 : Les différentes classes de bactériocines ainsi que de leurs mécanismes d'action (Taale et al., 2016)

La classe I regroupe les molécules peptidiques thermorésistantes possédant des acides aminés spécifiques ainsi que des modifications post-traductionnelles (Willey and van der Donk, 2007) : les lantipeptides (anciennement lantibiotiques), Parmi cette classe trois sous catégories sont retrouvées :

La classe I a, caractérisés par des petits peptides (< 5 kDa) linéaires. On y retrouve notamment la nisine, première bactériocine décrite appartenant à cette sous-classe (Rogers and Whittier, 1928), mais également la lacticine une bactériocine à double composante. Le mode d'action majoritaire est la perméabilisation de la membrane bactérienne due à la formation de pores (Drider and Rebuffat, 2011; Zacharof and Lovitt, 2012). Mais on peut également retrouver une inhibition de la synthèse du peptidoglycane grâce au blocage du lipide II ou une liaison à celui-ci, ce qui est le cas de la plantaricine C et la mersacidine.

La classe I b correspondant aux lantipeptides globulaires, interférant souvent avec des réactions enzymatiques et ayant une charge négative ou nulle (Deegan et al., 2006).

Une troisième sous-catégorie I c comprend les sactipeptides, caractérisés comme étant des peptides cycliques comportant de nombreuses modifications post-traductionnelles. La thurincine H, la subtilisine A et la propionicine F sont notamment retrouvées.

La classe II est caractérisée par des bactériocines sans modifications, ayant une taille inférieure à 10 kDa et avec des acides aminés standards (Zacharof and Lovitt, 2012). Ce sont des peptides thermo- et pH-résistants possédant un pont disulfure essentiel à l'activité inhibitrice et dont le mécanisme d'action est caractérisé par une perméabilisation de la membrane cellulaire. Cinq sous-catégories sont décrites :

La sous-catégorie II a rassemble des bactériocines proches de la pédiocine toutes actives contre le genre *Listeria*. Environ 50 bactériocines sont décrites dans cette sous-catégorie (Ennahar et al., 2000; Cui et al., 2012).

La sous-catégorie II b est caractérisée par des bactériocines avec deux composantes agissant de manière synergique dont les peptides sont synthétisés sous forme de précurseur qui sera ensuite clivé (Nissen-Meyer et al., 2011). La lactococcine G, première bactériocine à deux composantes décrite y figure notamment (Nissen-Meyer et al., 1992).

La sous-catégorie II c représente les peptides circulaires, avec dix bactériocines circulaires thermo- et pH-résistantes (Gabrielsen et al., 2014). Elle est divisée en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe contient les peptides les plus caractérisés avec la carnocycline A, l'entéroccine AS-48, la circularine A, la leuocycline, la garvicine ML, l'amolocycline, la lactocycline Q, et l'ubérolysine. Le second sous-groupe contient la gasséricine A et la butyrivibriocine AR10 qui sont produites par *Lactobacillus gasseri* et *Butyrivibrio fibrisolvens* respectivement.

La sous-catégorie II d contient des peptides linéaires mais n'ayant pas de ressemblance avec la pédiocine. Parmi cette sous-catégorie, les *sec*-dépendantes avec la lactococcine 972 par exemple, capable d'inhiber la formation de septum et induisant la libération de prophage (Madera et al., 2009) sont retrouvées. Les bactériocines sans peptide leader telle que la lacticine Q, formant un pore dans la membrane et entraînant une fuite des protéines (Yoneyama et al., 2009). Et enfin les autres bactériocines ne rentrant dans aucune de ces groupes, possédant un peptide leader, un transporteur ABC et *sec*-dépendantes. La lactococcine A, capable de perméabiliser la membrane cellulaire (Belkum et al., 1991), en fait partie.

La sous-catégorie II e, dont les bactériocines possèdent des peptides antimicrobiens. On y retrouve notamment la propionicine F provenant de la dégradation d'une protéine de *Propionibacterium freudenreichii*.

La classe III est caractérisée par des peptides sensibles à la chaleur et souvent associés à une activité enzymatique dont le mécanisme d'action est basé sur l'hydrolyse des liens peptidiques entre les peptidoglycane constituant la paroi cellulaire. En 2005 Paul Cotter proposa de les classer dans la catégorie des bactériolysines de par leur activité enzymatique (Cotter et al., 2005).

Une quatrième classe fut décrite par Oscáriz and Pisabarro en 2001 composée de bactériocines ayant un groupement non-protéique, glycoprotéique et/ou lipoprotéique. Parmi cette classe la Lacstrepsin produite par *Lactococcus lactis* et Lactocin 27 produite par *Lactobacillus helveticus* LS18 (Oscáriz and Pisabarro, 2001) sont retrouvées.

Le tableau 24 représente les principales bactériocines produites par les bactéries lactiques ainsi que leurs activités. Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreuses bactériocines dont certaines ont montré une activité anti-*Salmonella*, confirmant le fort potentiel inhibiteur de cette famille de bactéries.

Tableau 24 : Activité des principales bactériocines produites par des bactéries lactiques

Bactériocine	Producteur	Activité	Référence
Bactériocine L-1077	<i>Lb. salivarius</i> 1077	<i>S. Enteritidis</i>	(Svetoch et al., 2011)
Nisine	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Gram positif	(Holzapfel and Wood, 1995)
Nisine + EDTA	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Twenty <i>Salmonella</i> strains	(Stevens et al., 1991)
Plantaricine	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Salmonella</i> et <i>Listeria</i>	(Gong et al., 2010) (Chen et al., 2018)
Sakacine	<i>Lb. sakei</i>	Gram négatif	(Héquet et al., 2007)
Salivaricines	<i>Lb. salivarius</i>	Gram négatif	(Barrett et al., 2007)
Lactocines	<i>Lb. casei</i>	Gram négatif	(Vignolo et al., 1996)
Pédiocine PA-1	<i>P. acidilactici</i>	<i>Salmonella</i> et <i>Listeria</i>	(Rodríguez et al., 2002)
Penocine A	<i>P. pentosaceus</i>	Gram positif	(Diep et al., 2006)
Mésentéricine Y105	<i>Lc. mesenteroides</i>	<i>Listeria</i> <i>Bacillus cereus</i>	(Hécharde et al., 1992) (Muñoz et al., 2004)
Enterocine AS-48	<i>E. faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria</i>	(Muñoz et al., 2007)
Bactériocine 7293A et 7293B	<i>W. hellenica</i> BCC 7293	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. Typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	(Woraprayote et al., 2015)
Viridicine	<i>A. viridans</i>	Bactéries à Gram négatif et positif	(Ballester et al., 1977)
Carnobactériocine-A (Piscicoline-61)	<i>C. maltaromaticum</i>	<i>Carnobacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Listeria</i>	(Worobo et al., 1994)

A. : *Aerococcus*, *C.* : *Carnobacterium*, *E.* : *Enterococcus*, *Lc.* : *Leuconostoc*, *Lb.* : *Lactobacillus*, *L.* : *Lactococcus*, *P.* : *Pseudomonas*, *S.* : *Salmonella*, *W.* : *Weissella*

3.2. Compétition pour les nutriments présents dans la matrice

En 1962, la notion de compétition nutritionnelle est décrite par Jameson pour caractériser une interaction non dépendante d'effets par la production de bactériocine, diminution de pH ou présence de bactériophages, entre deux populations. Même si la production de bactériocine ainsi que la diminution du pH sont les éléments antagonistes les plus retrouvés chez les bactéries lactiques, la compétition nutritionnelle peut également être présente. Les sources de compétition nutritionnelle peuvent être variées. Aucune étude ne traitant le couple bactéries lactiques et *Salmonella* dans le cadre de cette compétition nutritionnelle, l'analyse bibliographique s'effectuera sur d'autres genres bactériens dont notamment les bactéries à Gram négatif.

Dans un premier temps la compétition pour des macroéléments tels que des sources d'azotes ou encore carbonées est retrouvée. Cette compétition s'observe notamment dans la rhizosphère où le

sol peut parfois être limitant en sources carbonées et/ou azotées. Une compétition nutritionnelle pour le nitrate de potassium présent dans le sol a été mise en évidence entre le genre *Fusarium* et les bactéries du sol (Marshall and Alexander, 1960). Une compétition a pu être également mise en évidence entre *Clostridium difficile* et le microbiote de colon chez la souris pour une source carbonée bien connue, le glucose (Wilson and Perini, 1988). Une étude réalisée dans une matrice saumon a mis en évidence une souche de *Carnobacterium* non productrice de bactériocines et active uniquement en cellules vivantes contre *Listeria monocytogenes* (Nilsson et al., 1999). Une seconde étude réalisée sur ces deux espèces a mis en évidence une réduction de la croissance de *L. monocytogenes* par *C. maltaromaticum* en partie liée à l'épuisement du glucose dans le milieu (Nilsson et al., 2005).

D'autres éléments chimiques (tel que le fer, le potassium, le calcium...) importants dans la croissance bactérienne et la production d'énergie peuvent être enjeux de cette compétition. Le fer, peu disponible à l'état libre, est un facteur essentiel pour la croissance de nombreux micro-organismes et est utilisé comme transporteur d'électron dans la chaîne respiratoire. Certains micro-organismes ont développé des systèmes de captation de ce fer empêchant les autres micro-organismes d'utiliser ce facteur (Gram et al., 2002). Parmi les bactéries possédant ce mécanisme de captation du fer le genre *Pseudomonas* est retrouvé. L'espèce *Shewanella putrefaciens* est également retrouvée. Certaines souches de *Salmonella* sont capables de produire deux sidérophores, l'aérobactine, majoritairement retrouvé chez *E. coli* (Visca et al., 1991) et l'enterobactine (Benjamin et al., 1985). Dans les matrices comme les poissons ou le fromage (Ong and Neilands, 1979) ces sidérophores sont uniquement produits lorsque quand la concentration en fer est limitante. Ces systèmes de captation spécifiques à des éléments présents dans la matrice en quantité limitante s'appliquent également dans le cas des facteurs de croissance tels que les acides aminés et les vitamines. En effet certaines bactéries telles que *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* sont capables de métaboliser très rapidement les vitamines et donc de diminuer la quantité disponible pour certains pathogènes tels que *S. aureus* lors d'une co-culture (Even et al., 2009). Une étude a mis en évidence le potentiel de facteur limitant du fer pour la croissance de bactéries d'affinages du fromage (Monnet et al., 2012). L'ajout de fer ainsi que du sidérophore desferrioxamine B en modèle fromage permettait de stimuler la croissance des bactéries des genres *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* (effet souche-dépendant). Chez *Arthrobacter* l'ajout du sidérophore augmentait l'expression deux gènes impliqués dans le transport du couple fer-sidérophore, et l'ajout de fer diminuait son expression.

D'autres éléments peuvent être source de compétition et facteurs de croissance chez *Salmonella*. Une étude a mis en évidence une diminution de l'infection à *Salmonella* chez des poulets par la modulation de leur homéostasie systémique au zinc (Wu et al., 2020). En effet la réponse à

l'infection par *Salmonella* a entraîné une diminution du zinc sérique 3 jours après l'inoculation et une augmentation de la teneur en zinc du foie après 1 jour.

Le magnésium semble également être un élément important. Une étude a montré chez la souris que la diminution légère de la disponibilité du fer et l'accès fortement restreint au magnésium par le facteur de résistance de l'hôte pléiotropique SLC11A1 permettait de réduire la réplication de *Salmonella* (Cunrath and Bumann, 2019).

Cependant il est parfois difficile de mettre en évidence la compétition nutritionnelle car elle est souvent combinée avec d'autres mécanismes d'action tels que la production de composés ou la diminution du pH. De plus, d'autres facteurs entrent en jeu lors de co-culture à savoir la rapport d'inoculum entre les deux souches (Mellefont et al., 2008).

4. Principaux micro-organismes impliqués et utilisés en industrie laitière

Une majorité des bactéries caractérisées pour leur pouvoir bioprotecteur appartiennent au groupe des bactéries lactiques. Dans la filière laitière elles représentent la principale alternative à l'ajout de conservateurs (Leyva Salas et al., 2017). En plus de leurs rôles dans le processus de transformation elles sont dotées d'un effet barrière contre des micro-organismes potentiellement pathogènes. Une majorité des espèces possèdent le statut GRAS et sont considérées comme non pathogènes.

L'un des principaux genres bactériens impliqués dans la bioprotection en industrie laitière est le genre *Lactococcus*. Les sous-espèces *L. lactis* subsp. *lactis* et *L. lactis* subsp. *cremoris* sont retrouvées dans la fabrication de fromages ou encore de matrices laitière fermentées. Les souches du biovar *diacetylactis* sont capables de produire du diacétyle, ayant un pouvoir antimicrobien (Lahtinen et al., 2011). En plus de la production de composés (voir section 4.2.5) ils acidifient la matrice et, en plus de contribuer à la formation du caillé, inhibent la croissance de flores d'altération et/ou pathogènes. Les sous-espèces *cremoris* et *lactis* sont retrouvées dans la fabrication de fromages du type Cheddar, Camembert et Tilsit (Whitman, 2009)

Le genre *Leuconostoc*, et plus particulièrement la sous-espèce *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* contribuant à la formation du persillage des fromages, est utilisé en tant que bioprotecteur grâce à son activité contre des bactéries à Gram positif via la production de bactériocine, souche-dépendante (voir section 4.2.5)

Tout comme les lactocoques, les lactobacilles sont très impliqués dans l'industrie laitière. Différentes espèces interviennent en fonction de la technologie : *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Lb. brevis*

dans la fabrication de fromage, et la sous espèce *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pour le yaourt et les pâtes pressées et filées. L'activité bioprotectrice de ce genre cible essentiellement la flore fongique (levures et moisissures) mais certaines souches de *Lb. plantarum* sont capables d'inhiber *L. monocytogenes* (Ennahar et al., 1998). Le tableau 25 montre quelques espèces de *Lactobacillus* inhibitrices de la flore fongique *in vitro*. Le spectre d'action s'étend à des souches de plusieurs espèces, voire de plusieurs genres.

L'association entre *Acidipropionibacterium* (anc. *Propionibacterium*) *jensenii* et *Lactobacillus paracasei* a également mis en évidence une inhibition de levures d'altération (*Candida* et *Zygosaccharomyces*) (Wathes et al., 1988). Les genres *Propionibacterium* et *Acidipropionibacterium* essentiellement utilisés dans la fabrication de fromage de type emmental, sont bien connus pour leur production d'acide propionique ayant des activités anti-fongiques.

Tableau 25 : Différentes espèces de lactobacilles possédant une activité antifongique sur milieu gélosé ou dans leur surnageant de culture en milieu MRS (Rouxel, 2019)

Espèce	Cible	Référence
<i>L. acidophilus</i>	<i>Penicillium</i> sp. <i>P. digitatum</i> <i>F. graminearum</i> <i>G. citri-aurantii</i>	(Gerez et al., 2013)
<i>L. brevis</i>	<i>A. niger</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>K. marxianus</i> <i>M. guillermondii</i> <i>P. camemberti</i> <i>P. roqueforti</i> <i>R. oryzae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T. candida</i>	(Falguni et al., 2010; Mauch et al., 2010)
<i>L. casei</i>	<i>Penicillium</i> sp. <i>P. digitatum</i> <i>F. graminearum</i> <i>G. citri-aurantii</i>	(Gerez et al., 2013)
<i>L. paracasei</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. blankii</i> <i>C. pseudointermedi</i>	(Atanassova et al., 2003)

A. : *Aspergillus*, *C.* : *Candida*, *F.* : *Fusarium*, *G.* : *Geotrichum*, *K.* : *Kluyveromyces*, *M.* : *Meyerozyma*, *P.* : *Penicillium*, *R.* : *Rhizopus*, *S.* : *Saccharomyces*, *T.* : *Torulopsi*

L'espèce *Carnobacterium maltaromaticum* peut aussi être impliquée en fabrication fromagère dans la bioprotection notamment grâce à la synthèse de bactériocines (Afzal et al., 2013).

Si de nombreux genres bactériens sont impliqués en industrie laitière et fromagère pour leurs activités anti-bactériennes et anti-fongiques, des levures sont également retrouvées. L'espèce *Geotrichum candidum* est bien connue pour son utilisation dans l'industrie laitière notamment pour sa contribution à la formation de la croûte de certains fromages. Si peu d'études ont mis en évidence son rôle bioprotecteur dans la matrice fromagère il a néanmoins été mis en évidence son implication dans l'inhibition de la croissance de bactéries à Gram négatif, positif ainsi que de levures et moisissures (Gueguen, 1984). Une étude réalisée quelques années plus tard a mis en évidence une inhibition d'une souche de *Listeria monocytogenes* par une souche de *Geotrichum candidum* via la production d'acide D-3-phenyllactique et d'acide D-3-indollactique (Dieuleveux et al., 1998). Comme évoqué précédemment c'est une levure notamment utilisée pour sa vitesse de recouvrement limitant l'implantation de flores d'altération (Molimard, 1995) dont le genre *Mucor*.

Comme vu précédemment, cette notion de bioprotection inclut également les composés antimicrobiens produits par certaines espèces. On y retrouve notamment la nisine produite par certaines souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et qui possède le statut GRAS pour l'utilisation en industrie agroalimentaire. Elle est pour le moment l'unique bactériocine reconnue en tant qu'additif bioprotecteur dans plus de 50 pays. Elle est retrouvée notamment dans certains fromages (Holzapfel and Wood, 1995). Cependant l'utilisation directe de ces composés n'est pas possible dans le cadre de fromages AOP tel que le Camembert de Normandie puisqu'ils sont considérés comme étant des additifs.

Le tableau 26 fait un état des lieux des principales cultures bioprotectrices disponibles sur le marché dans l'industrie laitière et pouvant être applicables à d'autres domaines alimentaires. De manière générale dominent les bactéries lactiques, bien connues pour leurs propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques. Ces bactéries lactiques servent de levains de par leurs qualités en tant qu'acidifiant mais également agent antimicrobien (Leroy and De Vuyst, 2004; Gillor et al., 2008) ou entrent dans la catégorie des « non-starter lactic acid bacteria » (NSLAB). L'activité anti-bactérienne ne cible que les bactéries à Gram positif. Ces ferments bioprotecteurs correspondent à des souches seules mais également des cocktails. L'utilisation de cocktails peut permettre d'élargir le spectre d'activité, initialement très réduit. A ce jour, le nombre de souches bioprotectrices commercialisées pour une utilisation par l'industrie agroalimentaire reste limité. En effet, plusieurs paramètres importants, au-delà de l'activité, sont à valider en amont avant l'utilisation en industrie alimentaire (présence de gènes de résistance, production d'amines biogènes, de toxines, aptitude à la production).

Tableau 26: Liste des principaux ferments bioprotecteurs commercialisés pour des applications laitières

Nom du produit	Composition	Activité protectrice	Application	Compagnie
BS-10, 20 et 30	<i>L.lactis</i> subsp <i>lactis</i> (Nisine)	<i>Candidum</i> sp. <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Fromages Hollandais et Continentaux	CHR Hansen
FreshQ® 1	<i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	Levures Moisissures	Babeurre Crème Quarg Twarog Kéfir Fromages frais	CHR Hansen
FreshQ® 2 et 9	<i>Lb. rhamnosus</i>	Levures Moisissures	Fromages frais Yaourt Crème	CHR Hansen
FreshQ® 4	<i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	Levures Moisissures	Fromages frais Yaourt Crème	CHR Hansen
FreshQ® 5	<i>Lb. paracasei</i>	Levures Moisissures	Yaourt	CHR Hansen
FreshQ® 1	<i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	Levures Moisissures	Tout type de fromage	CHR Hansen
HOLDBAC® LC	<i>Lb. rhamnosus</i>	Contrôle de la croissance des genres : <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> hétérofermentaires <i>Enterococcus</i>	Fromage à pâte dure et semi- dure	DuPont Danisco
HOLDBAC® Listeria	<i>Lb. plantarum</i>	Contrôle de la croissance de <i>Listeria</i>	Fromages à pâte molle Fromages à croûte lavée	DuPont Danisco
HOLDBAC® YM-XPM	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paracasei</i>	Contrôle de la croissance des levures et moisissures	Yaourts doux et très doux	DuPont Danisco
HOLDBAC® YM-XPk	<i>Lb. plantarum</i>	Contrôle de la croissance des levures et moisissures	Fromages (tout type)	DuPont Danisco
Sigma 23	Mélange de 3 levures		Fromages (tout type)	
Sigma 50	<i>G. candidum</i>	Mucor		Coquard
Sigma 52	<i>G. candidum</i>			

C. : *Clostridium*, L. : *Lactococcus*, Lb. : *Lactobacillus*

5. Critères essentiels à l'utilisation de micro-organismes bioprotecteurs en industrie alimentaire

L'utilisation de cultures bioprotectrices permettant d'inhiber des flores pathogènes ou d'altération en industrie est bien connue mais peu développée. Afin d'obtenir une souche utilisable en industrie il y a beaucoup d'étapes de validation. En effet les conditions de criblage en laboratoire et les processus de fabrication industriels sont bien différents et peuvent altérer voire supprimer l'effet antagoniste de la souche.

5.1. Criblage des isolats

La mise en évidence d'inhibition d'isolats face à des pathogènes tels que *Salmonella* s'effectue généralement par des méthodes classiques. Les méthodes de diffusion sur gélose ainsi que de dilutions qui sont très utilisées pour la mise en évidence d'une activité anti-bactérienne (Janssen et al., 1987) sont retrouvées. Parmi la méthode de diffusion, plusieurs variantes existent avec la diffusion sur disque, par puits ou encore par dilution de gélose.

Le problème souvent rencontré est une perte de l'activité inhibitrice lors du passage d'un milieu de laboratoire à une matrice alimentaire. Cela peut être dû à une absence ou une modification de croissance de l'isolat mais également aux changements des conditions physico-chimiques pouvant être défavorables à la production d'un composé ou la croissance de la souche. Une molécule active dans une matrice alimentaire ne le sera pas forcément pour une autre. Dans le cas de la nisine par exemple, une forte activité en matrice lait mais une perte d'activité en matrice carnée est observée (Stergiou et al., 2006). En effet, les interactions avec des composés de la matrice semblent changer la conformation de la molécule active. Afin d'éviter une grande perte d'activité entre le milieu classique de laboratoire et la matrice alimentaire certains milieux proches de la composition chimique de la matrice peuvent être utilisés.

Dans le cas de la matrice laitière trois milieux mimant la composition du fromage sont retrouvés dans la littérature : l'utilisation d'un retentât de lait issu d'une ultrafiltration (Garnier et al., 2018), d'un milieu chimiquement défini mimant la matrice Camembert (Mansour et al., 2008) ou encore d'une gélose au Camembert (Guichard and Bonnarne, 2005) ou bien au Livarot (Imran et al., 2012). Dans le cas du retentât de lait, les ferments lactiques du starter MA016 (*L. lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *lactis*) ainsi que de la présure ont été ajoutés avant de mimer la transformation réalisée en industrie. L'activité antagoniste de 67 bactéries lactiques contre *Mucor racemosus*, *Penicillium commune*, *Galactomyces geotrichum*, et *Yarrowia lipolytica* a été évaluée au cours du temps.

5.2. Innocuité des isolats

L'enjeu de la sécurité sanitaire des aliments est essentiel dans l'industrie agro-alimentaire. Même s'il subsiste un flou concernant la réglementation des souches utilisées en alimentaire, il existe néanmoins deux statuts spécifiques reconnus dans le monde : le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) mis en place par la FDA aux Etats-Unis, et le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) mis en place en Europe par l'EFSA pour l'alimentation animale. Certains ferments sont cependant utilisés en transformation depuis bien avant leur mise en place sur listes GRAS et/ou QPS. Une autre liste, spécifique au domaine laitier, émanant de la fédération internationale laitière en collaboration avec l'« European food and feed culture association » recense les micro-organismes déjà utilisés en agroalimentaire et permet d'avoir un historique des genres et espèces utilisés. En 2018, y figuraient 226 bactéries et 95 levures/moisissures (IDF, 2018).

Dans le cas de l'alimentation animale, il y a quatre critères clés sur lesquels le statut s'appuie : l'identification de la souche, l'état de connaissance, le type d'application et l'évaluation de sa pathogénicité. D'une manière générale, lorsqu'une espèce reçoit le statut QPS, toutes les souches reçoivent ce statut. Si l'espèce n'est pas répertoriée il faut suivre la réglementation 1997/258/EC relative aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Parmi les genres présents dans la liste QPS, de nombreuses bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus parvulus*, *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc citreum* sont retrouvés. Les espèces *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium freudenreichii* ou encore *Oenococcus oeni* peuvent aussi être retrouvés.

Cependant un ferment n'a pas l'obligation d'être sur la liste QPS de l'EFSA pour être commercialisé. En effet, ce statut a été mis en place à l'origine en appui de l'évaluation scientifique afin de permettre aux évaluateurs de se concentrer sur des micro-organismes présentant des incertitudes plus importantes. Parmi les micro-organismes très connus, *Penicillium roqueforti* et *P. camemberti* ne figurant pas sur la liste QPS mais rencontrés dans la fabrication du Roquefort et du Camembert respectivement sont retrouvés et possèdent un long historique d'utilisation.

Un des prérequis essentiels est de connaître l'identification exacte des candidats grâce à des techniques moléculaires fiables telle que l'analyse de l'ARNr 16S pour les bactéries. Une fois l'identification réalisée il est essentiel de regarder si la souche est connue pour la production de toxines ou de facteurs de virulence, si elle est pathogène ou encore si elle présente des résistances aux antibiotiques sur des éléments mobiles permettant des transferts entre souches. Le whole genome sequencing (WGS) permet d'apporter un nombre important d'informations avec l'analyse complète du génome permettant de révéler la présence des gènes impliqués dans des phénomènes de résistance, ou dans la production de facteurs de virulence et la pathogénicité. Les critères nécessaires à

l'obtention du statut QPS pour un microorganisme sont : une identité taxonomique clairement définie, un corpus de connaissances suffisant pour établir sa sécurité, une absence de propriétés pathogènes établie et une utilisation prévue clairement décrite (EFSA et al., 2019).

Un autre aspect très important est la potentialité de production d'amines biogènes. Dans le fromage la part d'acides aminés libres peut varier entre 5-15% offrant de ce point de vue des conditions idéales pour la formation des amines biogènes. En matrice alimentaire les plus retrouvées sont l'histamine, la putrescine, la tyramine et la cadavérine. Ces composés issus de la transformation d'acides aminés libres par certaines bactéries peuvent entraîner de fausses intoxications alimentaires ou encore simuler des réactions allergiques. Ces amines peuvent être produites par des bactéries (à Gram négatif et positif) mais également par des levures et des moisissures. La production de ces amines peut être mise en évidence par des milieux de cultures riches en acides aminés précurseurs et simples de lecture (Bover-Cid and Holzapfel, 1999). D'autres techniques moléculaires comme la PCR peuvent également être utilisées pour la détection de gènes d'enzymes permettant la transformation des acides aminés en amines biogènes (Coton and Coton, 2005). Dans le fromage des taux très élevés d'amines biogènes ont pu être observés avec jusqu'à 1 413 mg de cadavérine par kg de fromage, 945 mg/kg pour l'histamine, 414 mg/kg de putrescine et 713 mg/kg de tyramine (Wechsler et al., 2009). Le genre *Lactobacillus* est notamment connu pour la production d'amines biogènes dont la tyramine (Yilmaz and Gökmen, 2017) dans des matrices laitières. Pour des souches dont l'espèce n'a aucun historique de statut GPS ou GRAS il est également recommandé de tester l'innocuité sur des modèles comme *Galleria mellonella*, très utilisée pour l'étude hôte-pathogène (Bismuth et al., 2019). Il permet d'étudier les interactions hôte-pathogène et plusieurs études ont montrées des similitudes entre le système immunitaire inné de ce modèle avec celui des mammifères (Tsai et al., 2016; Bismuth et al., 2019). De plus, ce modèle est rapide et facile d'utilisation et permet un contrôle de la dose injectée tout en ayant un faible coût. Du fait de l'absence de nocicepteurs chez les insectes, et donc de l'absence de sensation de douleur (Eisemann et al., 1984), le modèle *Galleria* n'est pas soumis aux réglementations appliquées aux vertébrés. D'autres études mettent en avant l'utilisation d'un autre modèle, *Caenorhabditis elegans*, notamment pour tester la toxicité de médicaments dans l'industrie pharmaceutique (Kaletta and Hengartner, 2006; Hunt, 2017).

Enfin le dernier aspect important est la capacité de l'utilisation de ces isolats en industrie. L'objectif étant d'obtenir des souches facilement cultivables, capables de générer une biomasse importante et résistantes aux traitements tels que la lyophilisation ou la congélation (Zagorec and Christieans, 2013).

5.3. Réglementation

Malgré l'utilisation de ces bioprotecteurs dans les produits fermentés depuis de nombreuses années, il subsiste toujours un flou concernant la réglementation autour de l'ajout de ces flores protectrices. En effet, les ferments utilisés en industrie agroalimentaire sont soumis à une réglementation (règlement n°178/2002). L'utilisation de ces ferments dans de nouvelles matrices alimentaires doit respecter le règlement n°258/97/CE, afin que le produit ne présente aucun risque pour la consommation humaine avant sa mise sur le marché.

Il existe à l'heure actuelle plusieurs réglementations concernant les composants alimentaires. Tout d'abord le règlement CE 1331/2008 stipulant que les arômes alimentaires, additifs et enzymes doivent être présents sur la liste des substances autorisées. Pour chaque catégorie, une réglementation spécifique est attribuée : arômes alimentaires (CE 1334/2008), additifs (CE 1333/2008) et enzymes (CE 1332/2008). Cependant, à l'heure actuelle, les flores protectrices ne font partie d'aucune de ces catégories. En 2006 la Commission européenne a proposé de placer les bioprotecteurs parmi la catégorie des ingrédients ou des additifs alimentaires. Les flores participant à la transformation du produit par fermentation ou effet probiotique seraient qualifiées « d'ingrédient » et les flores apportant une activité technologique dans le processus ou pour la conservation seraient classées en tant « qu'additif ». La classification reste cependant difficile puisqu'il existe des ferments utilisés en industrie dont on a découvert également des propriétés de bioprotection. Des ferments ou ingrédients utilisés et autorisés dans certaines matrices pouvant être considérés comme bioprotecteurs dans d'autres matrices mais n'apportant aucun intérêt au niveau du processus de fabrication sont également retrouvés.

Le questionnement autour de la réglementation de l'utilisation de flores bioprotectrices repose sur la volonté d'assurer la sécurité sanitaire vis-à-vis du consommateur et de limiter les pertes alimentaires. En 2017 la direction générale de la concurrence de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) a reproché l'utilisation de *Carnobacterium divergens* et *Lactobacillus plantarum* par une fromagerie de la région Normande (Paris Normandie, 2017). Pour la DGCCRF ces deux bactéries ne figurant pas sur la liste officielle des ingrédients autorisés par le cahier des charges de l'AOP sont donc prohibées. Cependant pour le rapporteur public du Conseil d'État « l'ajout des bactéries neutralisant la *Listeria* ne peut être assimilable à un additif faisant fonction de conservateur ».

Malgré le flou qui existe encore sur la réglementation et l'utilisation des flores protectrices de nombreuses démarches entre scientifiques et acteurs de la commission européenne ont été effectuées. Il est important de continuer cette démarche afin de pouvoir mettre en place une réglementation conforme aux attentes sanitaires mais également positive pour le consommateur.

La figure 10 représente le schéma général du positionnement de *Salmonella* dans l'environnement laitier d'un point de vue de la bioprotection.

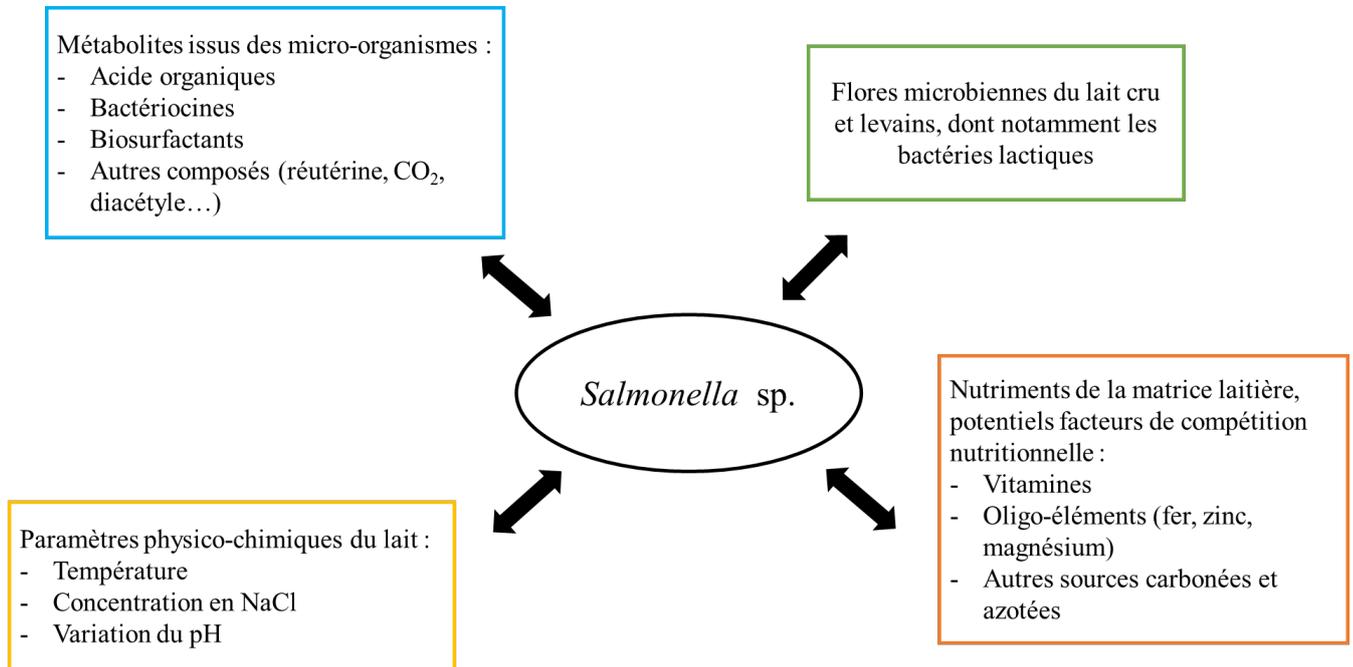


Figure 10 : Représentation des interactions de *Salmonella* dans l'environnement laitier dans le cas d'une approche par la bioprotection

CHAPITRE IV : Objectifs de l'étude

Dans le domaine du secteur laitier, le lait peut être soumis à de nombreuses sources de potentielle contamination par *Salmonella*. Si l'utilisation de traitements thermiques ou de conservateurs chimiques permet d'éliminer les pathogènes potentiellement présents, certaines filières fromagères ne peuvent pas appliquer ces solutions. C'est le cas des fromages normands AOP fabriqués au lait cru.

Le lait est une matière constituée de nutriments variés, avec la présence de composés tels que diverses vitamines, minéraux et sources de carbone et d'azote. Bien que non-optimal, c'est un milieu dans lequel le genre *Salmonella* se développe très bien et possède la capacité de survivre tout au long du processus de transformation de cette matière première.

Malgré les mesures préventives appliquées à la ferme, les voies de contaminations sont encore trop nombreuses et pas toujours contrôlables. Il est donc essentiel de trouver en aval des moyens de lutter contre l'implantation de *Salmonella* dans les produits laitiers.

La bioprotection est de plus en plus étudiée pour lutter contre l'implantation de microorganismes pathogènes dans les matrices ne pouvant être traitées par la chaleur ou d'autres technologies.

La recherche de candidats pouvant être utilisés en tant que bioprotecteur s'effectue via l'utilisation de techniques classiques telle que le « agar spot assay ». Cependant, ces méthodologies restent limitées quant à la quantité de souches à cribler mais également ne permettent pas de cribler les isolats dans des conditions proches d'une matrice complexe tel que le lait ou le fromage.

Ces méthodes mettent en évidence des mécanismes d'actions par production de molécules (acides organiques, biosurfactant, peroxyde d'hydrogène...) mais très peu s'intéressent aux interactions de *Salmonella* et des autres micro-organismes avec la matrice lait via la compétition nutritionnelle. S'il existe des études sur d'autres matrices avec d'autres pathogènes, la mise en évidence de compétition nutritionnelle s'effectue principalement lors d'une co-culture avec un seul autre isolat. Cependant la matrice lait possède de nombreux genres bactériens pouvant interagir entre eux et avec *Salmonella*. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthodologie « standardisée » permettant de mettre en évidence de manière précise la compétition nutritionnelle. De par la complexité des mécanismes d'action multiples, il n'est pas toujours facile d'évaluer de manière précise toutes les interactions mis en jeu, notamment celles associées à une compétition nutritionnelle.

Le but de ce projet est de détecter et mettre en interaction de façon innovante des micro-organismes au sein de communautés de complexité variable pour potentialiser leur effet barrière vis à vis de *Salmonella* rencontrées en transformations fromagères AOP au lait cru en Normandie. Pour cela plusieurs grands axes ont été dessinés.

Dans un premier temps il est nécessaire de **développer une méthodologie globale permettant un criblage à haut débit, par une ou plusieurs méthodes, d'agents microbiens potentiellement inhibiteurs**. Cette méthodologie doit être innovante car pouvant cibler simultanément des modes d'interaction variés : compétition nutritionnelle, amensalisme et antibiose. L'objectif de la mise au point de cette méthodologie est d'effectuer le criblage **dans des matrices et conditions proches du modèle réel, ici la matrice laitière (lait et fromage)**. Dans le cadre du projet, le criblage sera effectué à partir d'un grand nombre d'agent microbiens issus de l'environnement laitier de la collection régionale, le CONOBIAL. L'utilisation de souches issues de la région Normandie permet de garder une authenticité territoriale des fromages AOP Normands. Le criblage des souches sera effectué contre des sérovars de *Salmonella* retrouvés dans l'environnement laitier régional.

Dans un premier temps il s'agit d'investiguer divers types d'agents microbiens potentiellement inhibiteurs : bactéries et champignons microscopiques. L'objectif étant de créer et de mettre en place des lignes directrices pour sélectionner des agents utilisables en transformation fromagère. Cet objectif permettra de répondre au questionnement scientifique suivant : Quel potentiel bioprotecteur existe-il au sein des micro-organismes de tous types des environnements laitiers ? Y a-t-il de nouveaux genres ou espèces d'intérêt si l'on s'affranchit des à priori sur les genres/espèces ?

Dans un second temps, il s'agit **de construire des associations d'agents inhibiteurs sur la base de la complémentarité de leurs modes d'action et les valider en modèles *in vitro***. En effet l'objectif de ce projet est d'apporter des solutions dans la durée pour les producteurs et transformateurs. L'utilisation d'associations de souches antagonistes et ayant différents mécanismes d'action permettrait de limiter l'apparition de résistances. L'objectif ici était de créer des associations tout en répondant au questionnement scientifique suivant : peut-on associer des micro-organismes ayant des activités inhibitrices complémentaires afin d'en potentialiser l'effet ?

Enfin, il est nécessaire **d'expérimenter les associations sélectionnées en transformation fromagère** afin de suivre leur implantation et leurs interactions avec le processus de fabrication. Il s'agit aussi d'évaluer le potentiel anti-*Salmonella* des associations sélectionnées en matrice réelle lait et fromage pour répondre aux questionnementx suivants questionnements suivants : peut-on

conserver des activités inhibitrices observées en laboratoire en matrice réelle tout au long du processus de transformation du fromage ? Les qualités organoleptiques du fromage sont-elles modifiées ?

La figure 11 ci-dessous représente la démarche générale de cette étude.

MISE AU POINT DE MÉTHODOLOGIES DE CRIBLAGE

- Criblage « haut débit »
- Investigations de micro-organismes au sens large : bactéries et champignons microscopiques
- Mise en évidence de modes d'actions variés
- Utilisation de milieu avec une composition proche d'une matrice complexe

CONSTRUCTION D'ASSOCIATIONS « INTELLIGENTES »

- Créer des associations d'isolats
- Utiliser des isolats ayant différents mécanismes d'action
- Potentialiser l'effet anti-*Salmonella*

EXPÉRIMENTER EN TRANSFORMATION FROMAGÈRE AOP

- Incorporer les associations bioprotectrices en transformation fromagère
- Etudier les interactions avec les différentes flores et les qualités organoleptiques des fromages
- Evaluer le potentiel anti-*Salmonella* en matrice réelle

Figure 11 : Démarche générale de cette étude

MATERIELS ET METHODES

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : Matériels et méthodes

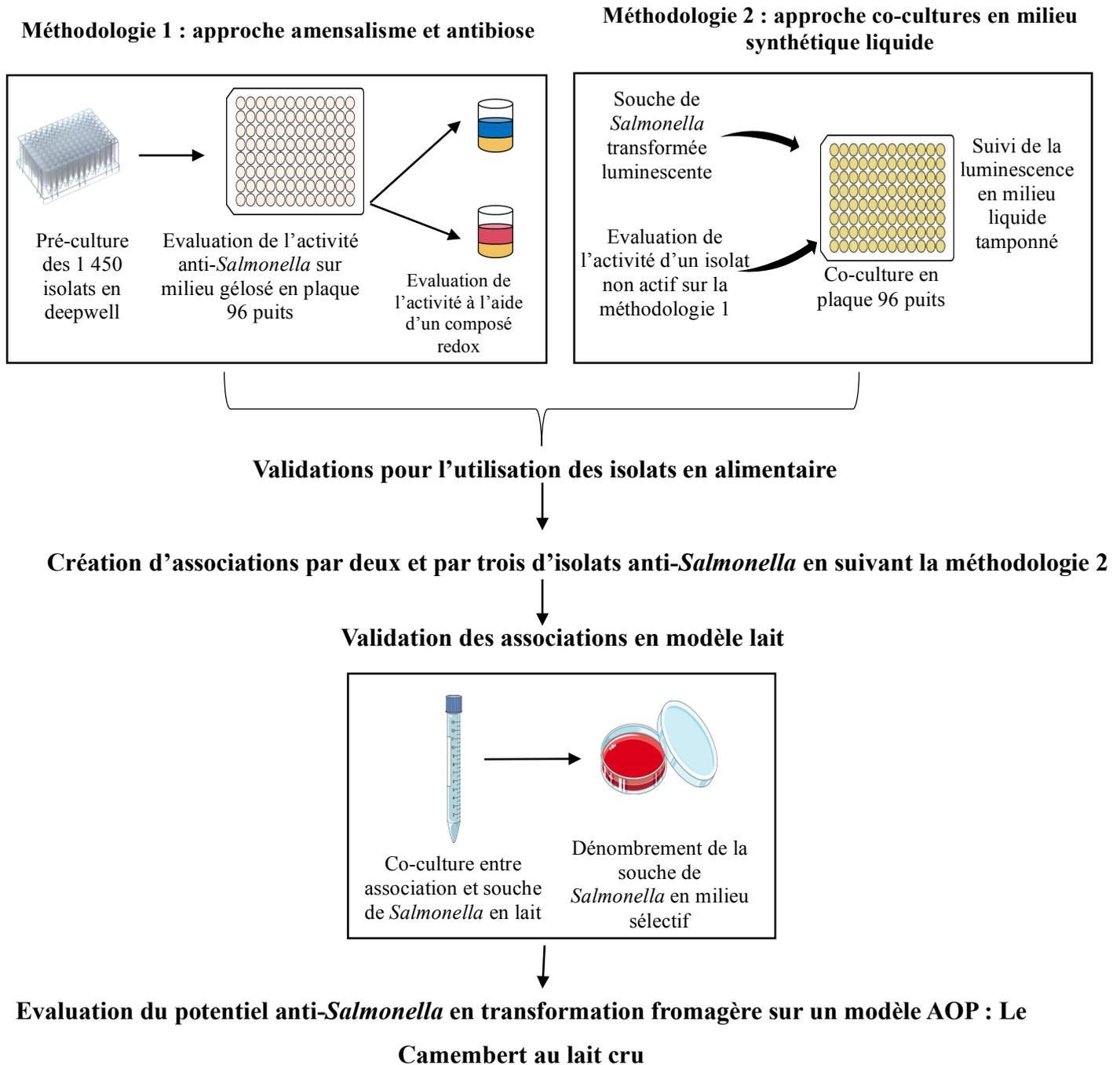


Figure 12 : Représentation générale de la démarche méthodologique pour l'étude d'agents anti-*Salmonella* en contexte laitier et fromager

La démarche méthodologique de cette étude est décrite dans la figure 12 ci-dessus. Dans un premier temps deux méthodes de criblage ont été développées afin de mettre en évidence des inhibitions par production de composés et par interactions lors de co-cultures en milieu liquide chimiquement défini. L'objectif principal de la méthodologie repose sur l'utilisation de milieux de culture mimant les conditions spécifiques à l'étude, ici la matrice laitière et fromagère. Les deux méthodes permettent également un criblage d'un nombre important d'isolats et ce de manière rapide. Les isolats sélectionnés ont ensuite été testés pour la résistance à différents antibiotiques, leur potentiel de production aux amines biogènes, leurs comportements face aux ferments. Les isolats sélectionnés ont ensuite été testés en milieu liquide en présence d'une souche de *Salmonella*, et seuls les plus inhibiteurs ont été retenus. Des créations d'associations par deux et par trois ont ensuite été réalisées afin de sélectionner les associations permettant une potentialisation d'action des isolats. L'activité des associations finales a ensuite été testée en modèle lait et fromage avant utilisation en transformation fromagère.

1. Souches et milieux de culture

1.1. Banque de souches utilisées

1.1.1. Souches criblées provenant de l'environnement laitier

L'activité anti-*Salmonella* de 1 450 isolats (bactéries et levures) issus du Conservatoire Normand de la Microbiodiversité Alimentaire (CONOBIAL, Université de Caen Normandie) a été étudiée. Tous les isolats issus du CONOBIAL n'ont pas encore été identifiés par séquençage d'ADN et la majorité des identifications sont « présumées ». L'ensemble des souches criblées proviennent de l'environnement laitier normand (fromage, lait, trayons de vaches, ambiance salle de traite, prairie...). La répartition des isolats en fonction des différents genres confirmés ou présumés est indiquée dans la figure 13. Lors de ce criblage, la famille des bactéries lactiques a majoritairement été ciblée de par sa forte proportion en environnement laitier et dans le CONOBIAL, cependant d'autres groupes tels que les *Actinobacteria*, *Staphylococcaceae*, *Proteobacteria* et des levures ont également été testés. L'ensemble des souches sont stockées à -80°C dans un milieu liquide approprié et variable selon les espèces en présence d'une concentration finale de glycérol de 15%.

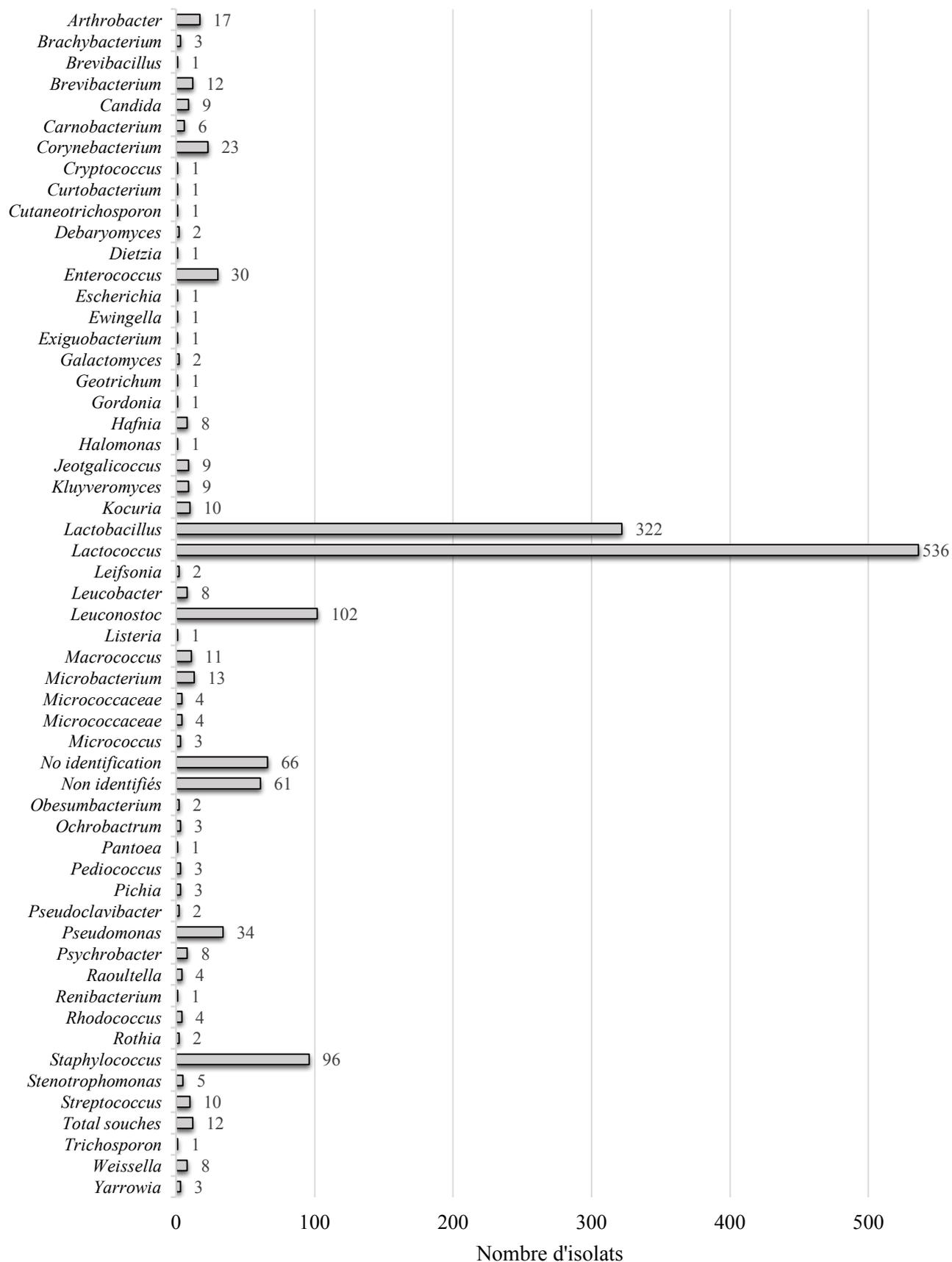


Figure 13 : Répartition des 1 450 isolats utilisés pour l'étude en fonction de leur genre présumé

1.1.2. Souches de Salmonella testées

Les souches de *Salmonella* utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau 27. Certaines de ces souches sont issues de l'Institut Pasteur ou proviennent de l'environnement laitier de Normandie et sont hébergées au sein du CONOBIAL. Toutes les souches sont conservées à -80°C en présence d'une concentration finale en glycérol de 15%. Le sérovar de l'ensemble des souches collectées en Normandie a été déterminé par le LABEO de l'Eure. On y retrouve majoritairement *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka (*S. Mbandaka*) et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo (*S. Montevideo*), prédominants en environnement laitier Normand depuis 2012.

Tableau 27 : Liste des différentes souches et sérovars de *Salmonella* utilisés ainsi que leur origine

Sérovar	Numéro de la souche	Origine	Source	Type
Mbandaka	UCMA 17913	Lait	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19835	Fumier	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19837	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19842	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19851	Enrubannage	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19892	Bouse	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19906	Aire d'alimentation	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19909	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19917	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 20264	Lait producteur	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 20269	-	CONOBIAL	Transformée à partir de UCMA 19909
	CIP 105.859	Fèces	Institut Pasteur	Sauvage
Montevideo	UCMA 19832	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19834	Lisier	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19840	Eau	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19867	Bouse	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19870	Eau de flaque	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19876	Mélange d'aliments	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19889	Bouse	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19904	Roues de tracteur	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 20260	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 20266	Lait producteur	CONOBIAL	Sauvage
	CIP 104.583	Singe	Institut Pasteur	Sauvage
Newport	CIP 105.629	Viande	Institut Pasteur	Sauvage
Typhimurium	UCMA 12999	Inconnue	Internationale	Sauvage
	UCMA 19933	Lait de mélange	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 20268	-	CONOBIAL	Transformée à partir de UCMA 12999
Ohio	UCMA 19862	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19886	Lait de tank	CONOBIAL	Sauvage
Panama	UCMA 17917	Camembert lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 17925	Fromage	CONOBIAL	Sauvage
Anatum	UCMA 17921	Fromage	CONOBIAL	Sauvage

1.2. Milieux et conditions de culture utilisés

Les souches de *Salmonella* ont été décongelées sur milieu Luria-Bertani (LB) gélosé (pH 7,4) et incubées à 37 °C pendant 24 heures. Elles ont ensuite été cultivées en routine dans 5 mL de milieu liquide LB à partir d'une colonie dans les mêmes conditions. Ce milieu LB est composé de 10 g/L de

peptone de caséine (Biokar), 5 g/L d'extrait de levure (Biokar) et 10 g/L de chlorure de sodium (Fisher).

Les isolats non-*Salmonella*, issus de l'environnement laitier, ont été décongelés sur milieu TSA-YE (pH 7,3) et incubés pendant 24 à 48 heures à 30°C selon leur vitesse de croissance. La composition de ce milieu est la suivante : 30 g/L de peptone de caséine (Biokar), 6 g/L d'extrait de levure (Biokar) et 15 g/L d'agar (Conda). Les isolats ont par la suite été cultivés en milieu liquide cœur-cerveau (BHI, pH 7,4, Conda) pendant 24 heures à 30°C.

2. Méthode de criblage par la production de composés

2.1. Démarche suivie

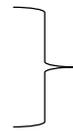
Peut-on associer des micro-organismes ayant des activités inhibitrices complémentaires afin d'en potentialiser l'effet ?

Étape 1 : Sélection de candidats anti-*Salmonella* avec différents mécanismes d'action

APPROCHE 1

Détection de micro-organismes à activité anti-*Salmonella* par mécanisme d'antibiose et/ou d'amensalisme en matrice laitière et fromagère

Comment adapter les méthodologies classiques de criblage à une banque de 1 450 isolats ?



1. Mise au point d'une méthode miniaturisée basée sur des techniques classiques
2. Utilisation d'un indicateur d'inhibition qualitatif et facile à lire

Quelles étapes du processus de fabrication cibler pour le criblage ?



Sélection de deux points au cours de la transformation, couvrant deux matrices : le lait en maturation secondaire et le fromage en seconde partie d'affinage

Comment se placer dans des conditions de criblage proches de la matrice de l'étude ?



1. Mise au point de milieux de culture opaques représentatifs de deux états au cours du processus de fabrication du fromage (lait et fromage)
2. Adaptation de la méthodologie pour l'utilisation de milieux opaques

Figure 14 : Représentation de la démarche suivie pour la mise au point d'une méthodologie permettant la mise en évidence de compétition par amensalisme et/ou antibiose en milieux opaque

2.2. Mise au point de la méthode de criblage miniaturisée en milieu opaque

Pour la mise au point de cette méthode trois milieux gélosés ont été utilisés : BHI, lait et fromage. Le milieu agar « lait » a été préparé à partir de 100 g/L de poudre de lait écrémé (Difco), 12 g/L d'agar (Biokar) et ajusté à un pH de 6,3. Ce milieu a été utilisé pour mimer la fin de maturation secondaire du lait. Le milieu agar « fromage » a été réalisé selon (Guichard and Bonnarme, 2005) en utilisant 60 g de caillé de Camembert non salé broyé, 12 g de chlorure de sodium et 1,7 g d'agar. Le pH a ensuite été ajusté à 6,8 afin de mimer les conditions retrouvées lors de la seconde partie d'affinage, permettant le développement des *Actinobacteria* testées, généralement acido-sensibles. Le milieu BHI a été utilisé à partir d'une poudre bouillon (Biokar) et de 15 g/L d'agar. Les milieux gélosés ont ensuite été coulés en plaque 96 puits.

La mise au point et la validation de la méthode a été effectuée à l'aide des isolats inhibiteurs suivants, dont l'activité anti-*Salmonella* était connue au laboratoire : *Pseudomonas lundensis* UCMA 7402, *Aerococcus urinaeequi* UCMA 5972 et *Pediococcus parvulus* UCMA 16814.

Les pré-cultures des isolats UCMA 5972, UCMA 7402 et UCMA 16814 ont été réalisées dans 1,5 mL de BHI en Deepwell® à partir d'une colonie et incubées à 30°C pendant 24 heures. Les mécanismes d'action de ces isolats n'étant pas caractérisés, des composés antimicrobiens seuls ont également été testés : de l'acide DL-lactique (850 mM) ainsi que du peroxyde d'hydrogène (1 mM) par application directe sur la première couche nonensemencée. Les concentrations utilisées pour la mise au point de la méthode correspondent aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) déterminées en amont pour la souche testée (*S. Newport* CIP 105.629).

Une fois les pré-cultures homogénéisées à l'aide d'une pipette multicanaux, un répliqueur a été utilisé pour venir déposer dans les plaques 96 puits l'équivalent d'une goutte par puits, sur trois milieux de culture gélosés différents (BHI agar pH 7,4, agar « lait » et agar « fromage »). Les plaques agar « lait » et BHI ont été incubées à 30°C pendant 24 heures et la plaque agar « fromage » à 15°C pendant 48 heures.

Après incubation, les plaques ont été traitées aux UVs (365 nm, 0,124 J/cm²) pendant 15 minutes. Ce traitement permet d'éviter un décollement de la colonie dans la suite du protocole risquant ensuite de contaminer la seconde couche de gélose, mais aussi l'inactivation partielle de l'isolat.

Un volume de 70 µL de surcouche de LB agar à 8 g/Lensemencée avec la souche de *Salmonella Newport* CIP 105.629 à une concentration finale de 10⁶ UFC/mL a ensuite été déposée sur les trois milieux testés. Cette souche a été sélectionnée grâce à de précédents travaux ayant mis

en évidence un effet antagoniste des trois isolats UCMA 5972, UCMA 7402 et UCMA 16814 testés contre cette souche (données internes). Les microplaques ont ensuite été incubées à 30°C durant 24 heures avant mise en contact avec 20 µL d'une solution de résazurine suivie d'une incubation pendant 5 min à température ambiante. Cette solution a été préparée le jour même à une concentration de 5 g/L dans du tampon phosphate salin à un pH de 7,2 (PBS, Fisher). La lecture du potentiel inhibiteur s'effectue à l'œil nu grâce à la réaction d'oxydo-réduction de la résazurine induisant un changement de couleur : un puit de couleur rose caractérise une chaîne respiratoire active et donc une activité métabolique de *Salmonella* et un puit bleu une chaîne respiratoire non active traduisant une inhibition de *Salmonella*.

2.3. Application de la méthode

La méthode a été réalisée selon le protocole de la section 2.2 du matériel et méthode sur l'ensemble des 1 450 isolats à cribler. Le potentiel d'inhibition de ces isolats a été testé contre trois souches de *Salmonella* : *S. Newport* CIP 105.629, *S. Mbandaka* CIP 105.859 et *S. Montevideo* CIP 104.583. Tous les isolats montrant une activité inhibitrice ont été testés une seconde fois afin de confirmer l'inhibition.

Un second criblage a ensuite été réalisé contre 26 souches de *Salmonella* de terrain (§ 1.1.2 p 85) afin d'élargir le panel de souches testées.

2.4. Etude de l'activité des surnageants

2.4.1. *Activité des surnageants en microplaque*

Les isolats sélectionnés à partir de la méthode criblage ont été cultivés soit en milieu chimiquement défini lait à 30°C pendant 24 heures, soit en milieu chimiquement défini fromage à 15°C pendant 48 heures, avec une agitation de 150 rpm. Pour cela le milieu décrit par (Mansour et al., 2008) a été adapté et utilisé pour la matrice fromagère et pour la matrice laitière. Le cobalt, toxique et CMR, a été éliminé et remplacé par du cuivre à une concentration identifiée précédemment par la FAO (1998). Dans le cadre du criblage, les deux milieux chimiquement définis ont été réalisés en version tamponnée afin d'éviter la sélection d'inhibition par effet pH.

Le tableau 28 met en évidence la composition des deux milieux. Pour le milieu lait, la concentration en lactose et en acide lactique a été ajustée pour représenter la fin de maturation secondaire. Les pH ont été ensuite ajustés à 6,3 pour le milieu chimiquement défini lait et à 6,8 pour le milieu chimiquement défini fromage.

Tableau 28 : Composition des milieux chimiquement définis lait et fromage

Concentration (g/L)	Milieu chimiquement défini lait	Milieu chimiquement défini fromage
Lactose	48,5	20
Lactate de sodium 60%	1	18
Acétate de sodium	1	
Citrate d'ammonium	0,6	
KH ₂ PO ₄	9	
K ₂ HPO ₄	7,5	
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,2	
FeCl ₂ 4H ₂ O	0,011	
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,050	
ZnCl ₂	0,005	
CuCl ₂	0,003	
L-Alanine	0,24	
L-Arginine	0,12	
L-Asparagine	0,34	
L-Cystéine	0,17	
L-Glutamine	0,51	
L-Glycine	0,17	
L-Histidine	0,11	
L-Isoleucine	0,20	
L-Leucine	0,47	
L-Lysine	0,35	
L-Méthionine	0,12	
Phénylalanine	0,28	
L-Proline	0,68	
L-Sérine	0,34	
Thréonine	0,23	
Tryptophane	0,05	

Concentration (g/L)	Milieu chimiquement défini lait	Milieu chimiquement défini fromage
Tyrosine		0,29
Valine		0,33
Adénine		0,010
Guanine		0,010
Uracile		0,010
Xanthine		0,010
Acide P-aminobenzoïque		0,010
Biotine		0,010
Cyano-cobalamine		0,001
Acide folique		0,001
Inosine		0,005
Acide nicotinique		0,001
Acide orotique		0,005
Panthothénate de calcium		0,001
Pyridoxamine		0,005
Pyridoxine		0,002
Riboflavine		0,001
Thiamine		0,001
Acide D,L 6-8 thioctique		0,0025
Thymidine		0,005

Les surnageants ont ensuite été obtenus en centrifugeant les tubes à 4 149 g pendant 15 min (Megastar 1,6R, VWR). Après filtration au travers d'un filtre de porosité 0,45 µm, les surnageants ont été stockés à -20°C ou directement analysés.

L'activité des surnageants a été évaluée contre la souche *Salmonella enterica* Mbandaka CIP 105.859. Quatre conditions ont été testées : surnageant non traité, surnageant neutralisé, surnageant neutralisé traité à la catalase et surnageant neutralisé traité à la pronase.

Après neutralisation à l'aide d'une solution de NaOH à 6N, les surnageants ont été soit traités à la catalase (100 mg/mL, Sigma) pendant 30 minutes à 30°C soit à la pronase E (100 mg/mL, Serva) pendant 2 heures à 37°C. Cent microlitres de surnageant (traité ou non) ont ensuite été mis en contact avec 100 µL de la culture de *Salmonella* ajustée à une densité optique (600 nm) de 0,05 dans du bouillon LB concentré deux fois. Après 24 heures d'incubation à 30°C, le pouvoir d'inhibition des surnageants contre *Salmonella* a été exprimé par une lecture du ratio de DO 600 nm entre la souche de *Salmonella* seule et celle en présence du surnageant. Les surnageants ont été considérés actifs quand au moins 80% d'inhibition de croissance ont été observables par rapport à la DO de la souche de *Salmonella* seule. La perte ou la diminution d'activité après neutralisation, traitement à la catalase ou à la protéase indique l'implication au moins partielle d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène ou de molécule de nature protéique, respectivement.

La production de peroxyde d'hydrogène a été confirmée par l'utilisation de bandelettes (Dosatest® 0-100 mg/mL, VWR) sur les surnageants non traités, permettant d'obtenir une évaluation de la concentration à l'aide d'une gamme comprise entre 0 et 100 mg/mL.

La production de biosurfactants a été évaluée à l'aide du test de la goutte (Walter et al., 2010). Pour cela, 5 µL de surnageant non traité ont été déposés sur une surface hydrophobe (Parafilm®) en présence d'un microlitre de bleu de méthylène, permettant de mieux visualiser la goutte. La forme de la goutte, traduisant la présence de molécules tensioactives telles que les biosurfactants, a ensuite été comparée au témoin négatif, du milieu stérile. La production de biosurfactants se traduira par une goutte en forme allongée, en comparaison au témoin dont la goutte sera bien ronde et bombée.

2.4.2. Détection des acides organiques par HPLC

L'analyse des surnageants a été réalisée à l'aide d'un appareil HPLC Waters Alliance composé d'un module de séparation HPLC e2695 couplé à un détecteur UV (2998 Photodiode Array Detector) ainsi qu'à un réfractomètre (2414 Refractive Index Detector) piloté par le logiciel Empower. La colonne utilisée pour l'analyse a été la Carbomix HNP5 8% cross-linking 7.8x300 mm de chez Sepax avec un débit de 0,6 mL/min.

Afin de déterminer les molécules produites, les surnageants ont été dilués au demi dans la phase mobile (du H₂SO₄ 5 mM). Un volume de 10 µL a ensuite été injecté dans la colonne. L'élution a été réalisée en mode isocratique pendant 30 minutes à 40°C en utilisant un tampon H₂SO₄ 5 mM comme phase mobile. La détection a ensuite été réalisée en UV (210 nm) afin de mettre en évidence

la présence d'acides organiques. La quantification des acides lactique et acétique a été réalisée à l'aide d'une gamme de standards allant de 2 mM à 64 mM.

3. Méthode de criblage par interaction en milieu liquide

3.1. Démarche suivie

L'objectif de cette méthode, représentée dans la figure 15, était la mise en évidence d'une potentielle compétition nutritionnelle. L'approche pour la mise en place de cette méthode s'est effectuée par la mise en évidence des potentiels facteurs de compétition dans le lait ou le fromage entre *Salmonella* et d'autres microorganismes. Un milieu de culture chimiquement défini « lait » et un milieu chimiquement défini « fromage » ont été mis en place pour évaluer le comportement de *Salmonella* dans ces milieux en présence des isolats criblés.

Peut-on associer des micro-organismes ayant des activités inhibitrices complémentaires afin d'en potentialiser l'effet ?

Étape 1 : Sélection de candidats anti-*Salmonella* avec différents mécanismes d'action

APPROCHE 2

Détection de micro-organismes à activité anti-*Salmonella* par mécanisme d'interactions en matrice laitière et fromagère

Comment déterminer les potentiels facteurs de compétition dans une matrice ?

1. Quantifier les sources nutritives dans le lait (oligo-éléments)
2. Analyser les besoins de *Salmonella* en matrice lait
3. Mettre au point un milieu de culture liquide proche de la matrice laitière et fromagère

Quel choix de méthodologie ?

Utilisation d'une méthode permettant le suivi de croissance de *Salmonella* en co-culture de manière quantitatif et en temps réel

Figure 15 : Représentation de la démarche suivie pour la mise au point d'une méthodologie permettant la mise en évidence de compétition en milieux liquides

3.2. Mise au point de la méthode de criblage en milieu liquide chimiquement défini

3.2.1. *Quantification des minéraux présents dans le lait cru et des besoins nutritionnels de Salmonella*

Pour mettre en évidence des interactions lors de co-culture en matrice laitière, les potentiels nutriments enjeux de compétition ont dû être mis en évidence. Pour cela, la détermination de la consommation en sources carbonées chez *Salmonella* ont été évalués à l'aide de deux techniques : l'utilisation de plaques GEN III et la quantification d'oligo-éléments par ICP-MS.

3.2.1.1. Système BIOLOG GEN III MicroPlate™

Cette micro-méthode permet d'obtenir le profil biochimique de souches en se basant sur l'utilisation de ou la sensibilité à 94 composés (71 sources de carbone et 23 éléments chimiques). Ce système est basé sur un indicateur redox utilisant la production de NADH (concomitant avec la respiration cellulaire) comme rapporteur. Durant l'incubation, la respiration s'effectue et les cellules peuvent utiliser la source de carbone pour leur croissance, augmentant ainsi la respiration et provoquant la réaction oxydative du tétrazolium. Un phénotype est considéré positif lorsque la chaîne respiratoire est active, réduisant le chlorure de tétrazolium faisant apparaître un puits de couleur violette.

Pour réaliser ce test, 16 souches de *Salmonella enterica* (Tableau 29) ont été isolées sur milieu LB agar puis incubées 24 heures à 37°C. Le fluide IF-A GEN III fourni a ensuite étéensemencé à une DO de 0,2. A l'aide d'une pipette multicanaux les puits de la plaque GEN III ont été remplis avec 100 µL de la suspension cellulaire avant incubation à 30°C pendant 18 heures. L'utilisation de cette température d'incubation a été choisie pour représenter la maturation secondaire du lait. Les conditions d'incubation à 15°C n'ont pas été testées. Après incubation la plaque a été lue à l'aide d'un lecteur de microplaque en utilisant la lecture de DO à 600 nm. Un résultat est considéré positif (croissance) pour une valeur de DO supérieure à 0,30 à 600 nm correspondant à un puits de couleur violette.

Tableau 29 : Liste des souches utilisées pour la caractérisation du profil de *Salmonella enterica* par GEN III

Sérovar	Numéro de la souche	Origine	Source	Type
Mbandaka	UCMA 17798	Huître	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 17800	Eau de rivière	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 17853	Eau littoral	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 17913	Lait	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 17918	Lait de tank	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19837	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19842	Lait cru	CONOBIAL	Sauvage
Montevideo	UCMA 17801	Eau de rivière	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19867	Bouse	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19870	Eau de flaqué	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19876	Mélange d'aliments	CONOBIAL	Sauvage
Ohio	UCMA 19855	Eau abreuvoir	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 19886	Lait de tank	CONOBIAL	Sauvage
Panama	UCMA 17917	Camembert lait cru	CONOBIAL	Sauvage
	UCMA 17925	Fromage	CONOBIAL	Sauvage
Anatum	UCMA 17921	Fromage	CONOBIAL	Sauvage

3.2.1.2. Quantification d'éléments minéraux par ICP-MS

En collaboration avec la plateforme d'analyse PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie, SFICORE, Université de Caen Normandie), 22 éléments chimiques (Tableau 30) dont certains présents dans le lait et utilisés par *Salmonella*, ont été analysés par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS).

Dans un premier temps une analyse de la concentration des éléments présents dans du lait cru venant de deux fermes ainsi que dans du lait écrémé reconstitué à 10% (Difco, pH 7,2) a été réalisée. La minéralisation pour cette analyse a été effectuée directement à partir de la matière sèche du lait.

Une seconde analyse a été effectuée en lait écrémé reconstitué afin de mettre en évidence les minéraux consommés par *Salmonella* Typhimurium UCMA 12999 ainsi que *S. Mbandaka* CIP 105.859. Pour cela les souches de *Salmonella* ont été cultivées dans 5 ml de lait en poudre reconstitué à partir d'une colonie et incubées durant 24 heures à 30°C. Après deux étapes de centrifugation de 15 min à 4 149 g, les surnageants ont été minéralisés dans des bombes de Téflon. Cette étape a permis

une dissolution des minéraux sous haute température et est réalisée en présence d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène, dans le but de détruire les composants organiques. Une fois la minéralisation effectuée, les échantillons ont été analysés par HR ICP-MS Element 2 (ThermoFisher) et comparés à un témoin non ensemencé et centrifugé dans les mêmes conditions. L'analyse des deux souches a été réalisée en triplicata.

Tableau 30 : Eléments quantifiables par ICP-MS via la plateforme PLATIN'

Eléments chimiques			
¹¹ B	²³ Na	²⁴ Mg	³¹ P
³² S	³⁹ K	⁴⁴ Ca	⁵¹ V
⁵⁵ Mn	⁵⁶ Fe	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni
⁶³ Cu	⁶⁶ Zn	⁷⁸ Se	⁹⁵ Mo
¹¹¹ Cd	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As	¹³⁷ Ba
¹²¹ Sb	⁵² Cr	²⁷ Al	²⁸ Si
⁴⁷ Ti			

3.2.2. Transformation de souches de *Salmonella* avec le plasmide pBEN276

3.2.2.1. Plasmide pBEN276 : principe, extraction et quantification

Le plasmide utilisé pour la transformation des souches de *Salmonella* luminescentes est le plasmide pBEN276 créé par (Howe et al., 2010). Il est maintenu dans une souche DH5 α d'*Escherichia coli* et contient plusieurs sites (Figure 16) :

- Le promoteur P_{araBAD} qui est induit par la présence d'arabinose et permet la synthèse des protéines Tns A, B, C, D et E. Ces protéines sont impliquées dans la transposition du transgène.
- Le transgène, qui est caractérisé par l'ensemble de gènes *luxCDABE*. L'ensemble des gènes codants pour la luciférase catalysent la réaction d'oxydation du FMNH₂ en FMN. La luciférase catalyse la mono-oxygénation des aldéhydes aliphatiques à longue chaîne en acides correspondants, en utilisant un FMN réduit et de l'O₂. L'énergie libérée sous forme de photon résulte d'un état excité d'hydroxyde de flavine, émettant une lumière centrée autour de 490 nm. Cette réaction est dépendante d'une chaîne de transport d'électron active, et donc d'une activité métabolique. L'expression de la luminescence est directement corrélée avec une activité métabolique de la bactérie et donc indirectement, une croissance bactérienne.

- L'opéron *luxCDABE*, qui a été inséré par transposition à l'aide de Tn7, et dont l'expression constitutive est régulée par le promoteur d'*E. coli* P_{fr} . Ce système de transposition Tn7 s'intégrera à un endroit spécifique dans le chromosome de *Salmonella*, le site *attTn7*.
- Le plasmide contient une origine de réplication OriC thermosensible qui n'est plus effective à partir de 42°C permettant de curing le plasmide une fois la transposition réalisée.
- Le gène *bla* codant pour la bêta-lactamase et provenant d'*E. coli* conférant une résistance à l'ampicilline. Les souches utilisées pour la transformation ont été dans un premier testées afin de vérifier leur sensibilité à cet antibiotique.

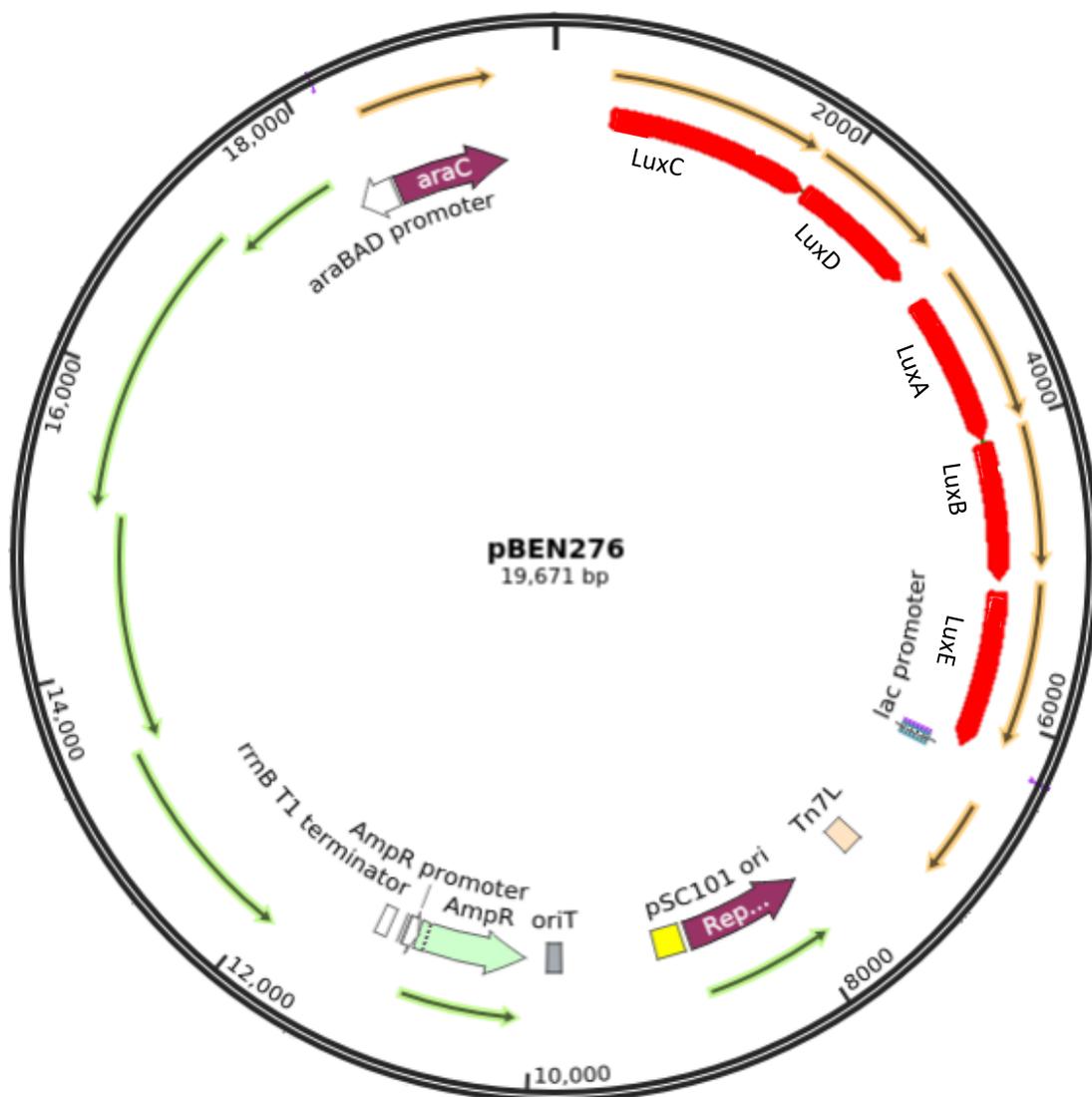


Figure 16: Représentation schématique du plasmide pBEN276 (d'après <https://www.addgene.org/69150/>)

L'extraction plasmique a été réalisée à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel®. Pour cela 8 mL d'une culture de nuit de la souche *E. coli* DH5 α a été réalisée en milieu LB puis centrifugée à 12 000 xg pendant 30 secondes. Le culot a été resuspendu dans 150 μ L de Buffer A1 et 250 μ L de Buffer A2. Après une incubation de 2 minutes à température ambiante, 350 μ L de Buffer A3 ont été ajoutés. La préparation a été centrifugée 3 minutes à 12 000 g. Le surnageant a ensuite été déposé sur une colonne avec membrane et centrifugé 30 secondes à 2 000 g. Le surnageant éliminé, 450 μ L de Buffer AQ ont été ajoutés à la colonne. Une étape de centrifugation de 1 minute à 2 000 g a été effectuée. Le surnageant une fois éliminé, l'ADN a été élué dans un nouveau tube à l'aide de 50 μ L de Buffer AE incubé 1 minute à température ambiante. Après centrifugation à 12 000 g pendant 1 minute, l'ADN récupéré a été quantifié à l'aide d'un lecteur (Tecan SPARK®) et déposé sur gel afin de visualiser une bande.

3.2.2.2. Sélection et préparation de cellules de *Salmonella* électrocompétentes

Les souches de *Salmonella* UCMA 19909 et UCMA 12999 ont dans un premier temps été testées pour leur sensibilité à l'ampicilline puisque le plasmide pBEN276 porte un gène de résistance à cet antibiotique. Ce criblage a été réalisé en isolant différentes souches de *Salmonella* sur gélose LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline (Sigma) avant incubation à 37°C pendant 24 heures. Seules les souches sensibles à cette concentration d'antibiotique ont été sélectionnées pour effectuer la transformation par le plasmide pBEN276.

Le milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) a été réalisé pour la transformation des souches de *Salmonella* à partir de tryptone (Biokar, 20 g/L), d'extrait de levure (Biokar, 5 g/L), de MgSO₄ (4,8 g/L, Sigma), de glucose (3,6 g/L, Sigma), de KCl (0,18 g/L, Alfa Aeser), et de NaCl (Fisher, 0,5 g/L). Ce milieu a été filtré à l'aide d'une unité de filtration à 0,20 μ M (Nalgene™ Rapid-Flow™) avec membrane en PES.

Une culture fraîche de *Salmonella* de 50 mL en bouillon LB à une concentration comprise entre 6.10^7 et 8.10^7 UFC/mL a été centrifugée 12 minutes à 4 000 g et à 4°C. Le surnageant a ensuite été éliminé, puis le culot resuspendu dans le volume initial avec de l'eau milliQ froide (4°C) et maintenu sur glace pendant 20 minutes. L'étape de centrifugation a été répétée une seconde fois avec les mêmes paramètres et le culot resuspendu dans un volume de 25 mL. Après 20 minutes sur glace, l'étape de centrifugation a été effectuée une troisième fois puis le culot resuspendu dans 2 mL de glycérol 10% froid (4°C). Après 20 minutes sur glace, une dernière centrifugation a été réalisée et le culot resuspendu avec du glycérol 10% froid dans un volume final de 500 μ L. Le stock de cellules électrocompétentes a été conservé à -20°C avant utilisation pour l'électroporation.

3.2.2.3. Transformation des souches de *Salmonella* avec le plasmide pBEN276

La transformation des souches *S. Typhimurium* UCMA 12999 et *S. Mbandaka* UCMA 19909 a été réalisée à l'aide d'un électroporateur (Eppendorf Multiporator). Après avoir rendu les deux souches de *Salmonella* électrocompétentes, 40 µL de suspension cellulaire ont été déposés dans une cuve d'électroporation (Eppendorf, diamètre entre les plaques : 1mm) préalablement maintenue dans la glace. A cela ont été ajoutés 2 µL de préparation de plasmide à une concentration comprise entre 25 et 250 ng/µL. L'électroporation a ensuite été réalisée avec les paramètres suivants :

- Mode prokaryotes
- Temps d'électroporation de 5 ms
- Voltage de 2 500 unités pour le sérovar Mbandaka et 1 800 unités pour Typhimurium

Après électroporation, 1 mL de milieu SOC préalablement chauffé à 37°C a immédiatement été ajouté. Le tout a été transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL afin d'être mis sous agitation (150 rpm) à 37°C pendant 1 heure. Un étalement de surface de 100 µL a ensuite été réalisé sur une gélose LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline afin de sélectionner les colonies contenant le plasmide portant la résistance à l'ampicilline. Après 24 heures à 37°C, les colonies ayant poussé ont été cultivées dans un bouillon LB contenant 0,1% d'arabinose afin d'induire la transposition. Une fois la transposition induite, un étalement de surface sur gélose LB classique a été réalisé avant incubation à 42°C pendant 16 heures permettant ainsi de curer le restant du plasmide présent. Les colonies ont ensuite été cultivées en milieu liquide LB à 42°C pendant 16 heures. La luminescence après culture de nuit a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Tecan SPARK®).

3.3. Validation et caractérisation des souches luminescentes

3.3.1. *Vérification de la transposition et lecture en temps réel*

Afin de vérifier la transposition, une culture en LB des deux souches transformées a été réalisée en mettant une colonie dans 5 mL de milieu. Après 24 heures à 37°C une mesure de luminescence a été effectuée à l'aide d'un lecteur de plaque (Tecan SPARK®).

Une seconde vérification a été effectuée en réalisant une cinétique à partir d'une cultureensemencée à DO (600 nm) 0,1 en milieu LB. Après 4 heures d'incubation une solution d'ampicilline à concentration finale de 800 µg/mL a été ajoutée dans les puits afin de mettre en évidence la mesure en temps réel de la luminescence.

3.3.2. Stabilité du transposon

La stabilité du transposon a été évaluée pendant une durée de 16 jours. Pour cela une pré-culture a été réalisée à partir d'une colonie inoculée dans 5 mL de bouillon LB. Des repiquages successifs ont été effectués tous les jours pendant 16 jours. Une mesure de la luminescence à 12 heures de croissance a été réalisée aux jours 1, 4, 7, 10, 13 et 15. Les souches transformées et non transformées ont été utilisées pour cette expérience.

3.3.3. Suivi et corrélation de la densité optique et de la luminescence

Une cinétique en milieu LB a été réalisée afin d'évaluer les différences de croissance entre souches transformées et souches sauvages. Pour cela une pré-culture de nuit de chaque souche a été réalisée et incubée à 37°C pendant 24 heures. Du milieu LB a ensuite étéensemencé à 0,1% en plaque 96 puits et incubé dans le lecteur de plaque pendant 24 heures à 37°C. Cette expérience a été réalisée deux fois : une pour le suivi de la densité optique et une autre pour le suivi de la luminescence. Pour le suivi de la luminescence des plaques à fond blanc (plaque fluoro NUNC, Thermofisher scientific™) ont été utilisées, pour le suivi de DO les plaques 96 puits (TC 96-wells, Sarstedt) ont été utilisées. Le suivi de la luminescence a été effectué par des mesures toutes les 30 minutes.

La croissance en milieu chimiquement défini a été comparée à celle obtenue en milieu LB. Pour cela des cultures ont été réalisées dans les différents milieux avec un ensemencement à 0,1%. Les plaques ont été incubées à 30°C pour le milieu LB et le milieu chimiquement défini lait et à 15°C pour le milieu chimiquement défini fromage. La mesure de la luminescence a ensuite été effectuée à 4, 7, 24 et 48h.

3.4. Application de la méthode de criblage

Le principe de la méthode repose sur la capacité des souches *Salmonella* Typhimurium UCMA 20268^{lux+} et Mbandaka UCMA 20269^{lux+} à émettre de la lumière lorsqu'elles sont métaboliquement actives. Afin d'éviter de sélectionner des mécanismes d'action par effet pH, les milieux chimiquement définis ont été réalisés en version tamponnée lors du criblage. Pour cela, à partir d'une colonie, des pré-cultures des isolats ainsi que des souches de *Salmonella* ont été réalisées en milieu chimiquement défini lait et fromage en Deepwell® dans un volume de 1,5 mL. Après incubation 24 heures à 30°C, 2 µL de pré-culture d'un isolat à cribler ont été mis en contact avec 2 µL de pré-culture de *Salmonella* dans une plaque 96 puits à fond blanc contenant 196 µL de milieu de culture chimiquement défini lait ou fromage. Le volume final dans la plaque était de 200 µL. Les conditions d'incubation ont été les suivantes : 24 heures à 30°C pour le milieu chimiquement défini lait et 48 heures à 15°C pour le milieu chimiquement défini fromage. La luminescence a été mesurée

à 4 heures (milieu de phase exponentielle) et 24 heures (phase stationnaire) pour le milieu chimiquement défini lait et un point d'analyse à 48 heures (phase stationnaire) a été ajouté pour le milieu chimiquement défini fromage.

Quatre-cents quatorze isolats (Figure 17) non actifs sur la première méthode de criblage ont été testés par cette seconde méthode une seule fois. La sélection des isolats actifs s'est effectuée par le point de mesure à 24 heures pour le milieu lait et à 48 heures pour le milieu fromage.

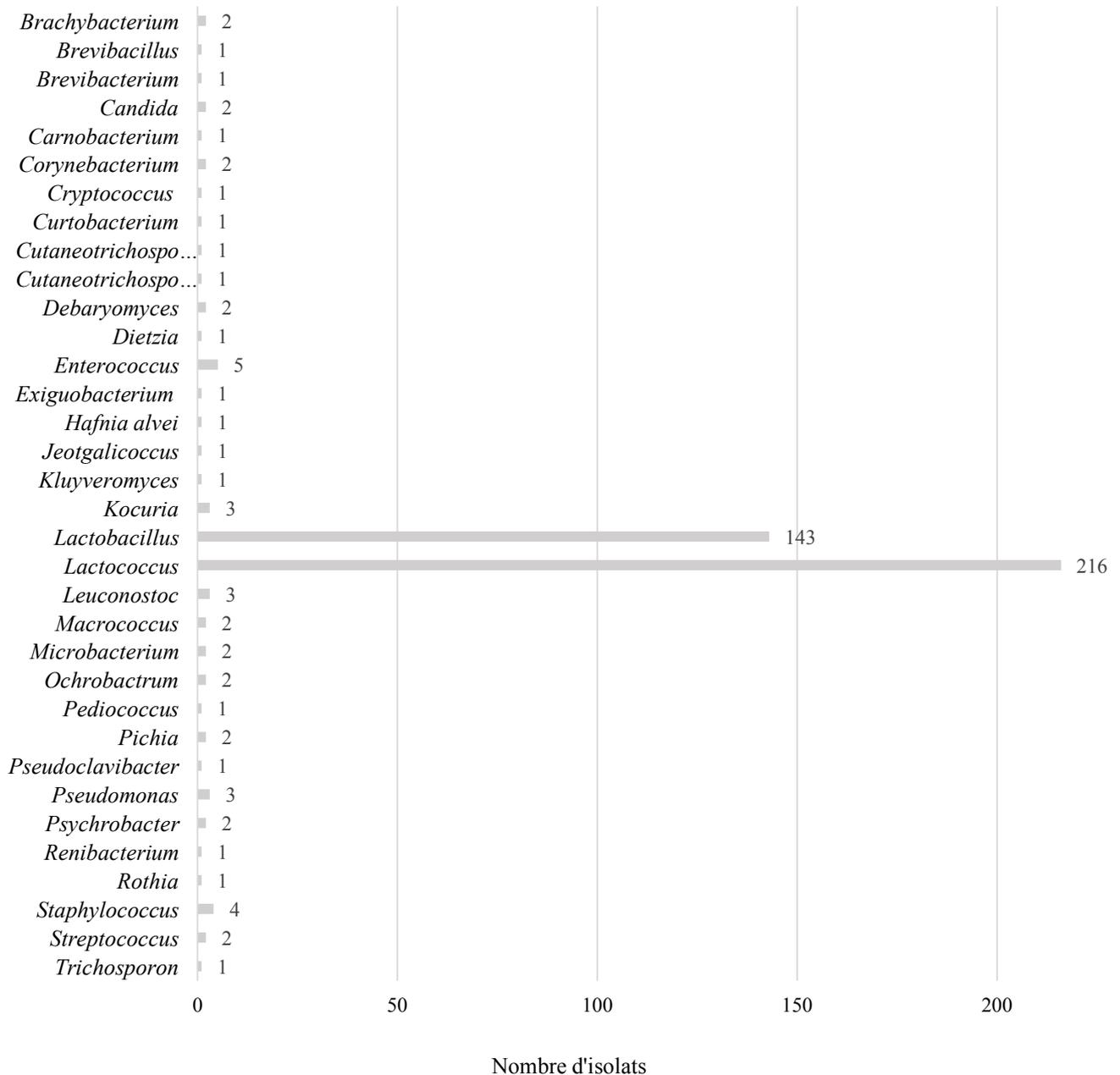


Figure 17 : Répartition des genres présumés des 414 souches utilisées pour le criblage en milieu liquide chimiquement défini

3.5. Mise en évidence de la levée d'inhibition par de potentiels facteurs de compétition en milieu chimiquement défini liquide

La mise en évidence de la levée d'inhibition a été étudiée grâce à quatre variantes de chacun des milieux chimiquement définis lait et fromage ayant une concentration deux fois plus importante soit en : vitamines, minéraux, acides aminés ou acide lactique. La même méthode que pour le criblage d'isolats a été utilisée et ce dans les mêmes conditions avec cette fois-ci une mesure de la luminescence à 4 et 24 heures pour le milieu lait et à 4, 24 et 48 heures pour le milieu fromage.

Les isolats ayant montré une inhibition de *Salmonella* en milieux chimiquement définis ont été évalués une seconde fois avec les milieux modifiés. Une restauration de la croissance de *Salmonella* dans l'un des milieux modifiés mettra en évidence un mécanisme d'action autour d'une interaction entre l'isolat et la souche de *Salmonella*.

4. Tests permettant la validation et la sélection des candidats bioprotecteurs pour l'utilisation en transformation fromagère

4.1. Démarche suivie

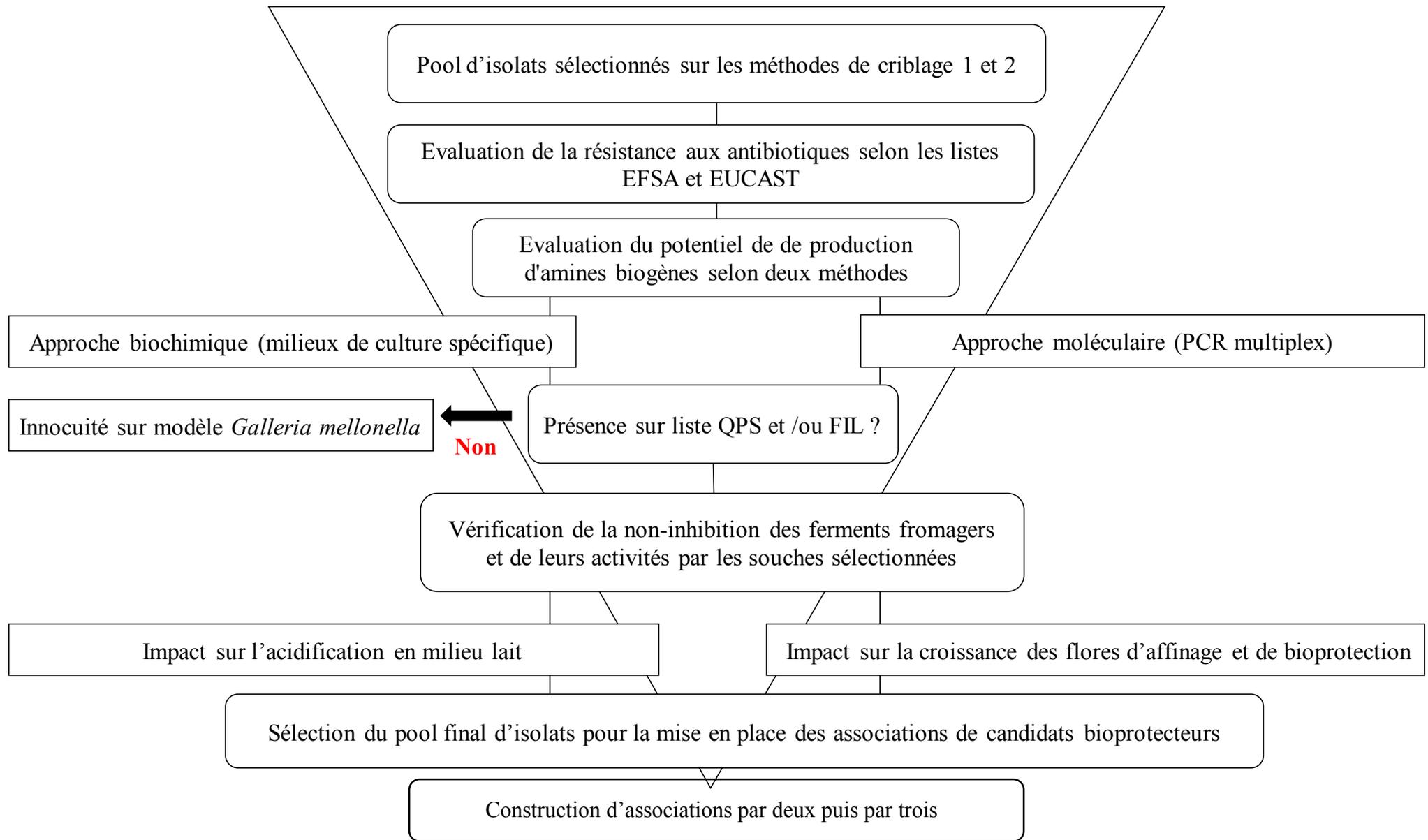


Figure 18 : Représentation générale de la démarche suivie pour la sélection des associations finales

4.2. Evaluation de la résistance aux antibiotiques

4.2.1. Milieux de culture

L'évaluation de la résistance à différents antibiotiques a été effectuée sur différents milieux de culture en fonction du genre bactérien :

- Mueller Hinton (Fluxa) + 5% de sang de mouton défibriné (Fisher) pour le genre *Aerococcus* à pH final 7,3
- M17 avec 5 g/L de lactose (Oxoid) pour le genre *Lactococcus* à pH 7,1
- Mueller Hinton pour les genres *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Raoultella* et *Enterococcus* à pH 7,3
- MRS (Biokar) pour le genre *Leuconostoc* à pH 6,2

Tous les milieux ont été incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures en fonction de la croissance des isolats.

4.2.2. Antibiotiques sélectionnés et méthodologie

Les antibiotiques testés sur les différents genres bactériens sont représentés dans le tableau 31 ci-dessous. Ils ont été sélectionnés à l'aide des listes de l'EFSA (EFSA, 2012) et de l'Eucast (The European Committee, 2020) préconisant les différents antibiotiques à tester le cadre d'ajout de micro-organismes en alimentaire et ce en fonction du genre/espèce bactérien(ne). Une étude des résistances naturelles des différents genres a également été effectuée grâce à l'utilisation du site médical Vidal (<https://www.vidal.fr>).

Tableau 31 : Liste des antibiotiques testés en fonction du genre bactérien

	<i>Aerococcus</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Raoultella</i>
Amikicine		✓				✓	✓
Ampicilline	✓		✓	✓			
Ceftazidime		✓				✓	
Chloramphenicol				✓	✓		
Ciprofloxacine	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Erythromycine				✓	✓		
Gentamicine		✓		✓	✓	✓	✓
Lévofloxacine	✓		✓			✓	
Pénicilline G	✓			✓			
Pipéracilline			✓				
Tétracycline	✓			✓	✓		✓
Vancomycine	✓		✓	✓			

Après réalisation, à partir d'une colonie, d'une culture de nuit dans 5 mL de milieu BHI, une centrifugation a été effectuée à 4 149 xg pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été éliminé et le culot resuspendu dans 5 mL de tryptone-sel pH 7. La densité optique à 600 nm (BioPhotometer D30, Eppendorf) des différents isolats a été ajustée entre 0,08 et 0,1. Trois écouvillonnages successifs ont ensuite été effectués à partir de cette suspension cellulaire sur les différentes géloses en fonction du genre bactérien. Après écouvillonnage, deux bandelettes e-test (Himedia ezy MIC™) ont été déposées par gélose ensemencée. Ces bandelettes contiennent un gradient de concentration d'antibiotiques allant de 0,16 à 256 µg/mL permettant, après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour chaque antibiotique.

Les listes de l'EFSA ainsi que de l'Eucast ont également permis de déterminer les différents breakpoints utilisés dans cette étude (Tableau 32). Les données n'étant pas présentes pour certaines espèces, la littérature scientifique nous a permis de sélectionner des breakpoints, notamment pour le genre *Raoultella*, qui sera ici basé sur les breakpoints des *Enterobacteriaceae* (Lerma et al., 2014;

Atıcı et al., 2018) et également *Aerococcus* dont la résistance à l'ampicilline sera basée sur celle des *Enterococcus*.

Tableau 32 : Liste des différents breakpoints retenus pour chaque antibiotique utilisé en fonction du genre bactérien

Genre bactérien	<i>Aerococcus</i>		<i>Alcaligenes</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Lactococcus</i>		<i>Leuconostoc</i>		<i>Pseudomonas</i>		<i>Raoultella</i>	
	S <	R >	S <	R >	S <	R >	S <	R >	S <	R >	S <	R >	S <	R >
Amikicine	-	-	4	8	-	-	-	-	-	-	8	16	8	16
Ampicilline	4	8			4	8	2	2	-	-	-	-	-	-
Ceftazidime	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-
Chloramphenicol	-	-	-	-	-	-	8	8	4	4	-	-	-	-
Ciprofloxacine	2	2	0,5	4	4	4	-	-	2	2	0,5	0,5	0,25	0,5
Erythromycine	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-
Gentamicine	-	-	2	4	-	-	32	32	16	16	4	4	2	4
Lévofloxacine	2	2	-	-	4	4	-	-	-	-	1	1	-	-
Pénicilline G	2	2	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-
Pipéracilline	-	-	-	-	Voir note 1		-	-	-	-	-	-	-	-
Tétracycline	4	4	-	-	-	-	4	4	8	8	-	-	4	4
Vancomycine	1	1	-	-	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-

Note 1 : la sensibilité à la piperacilline peut être déduite de celle à l'ampicilline

S, sensible

R, résistant

4.3. Potentiel de production d'amines biogènes

4.3.1. Souches et milieux de culture

Lors de la détection du potentiel de production d'amines biogènes, trois souches ont été utilisées en tant que témoin :

- La souche *Lactobacillus saerimneri* ATCC 33222 possédant les gènes associés et la capacité de production des amines biogènes histamine, putrescine et cadavérine ; et négative pour la tyramine

- La souche *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 possédant les gènes associés et la capacité de production de la tyramine et la putrescine ; et négative pour la cadavérine et l’histamine
- La souche *Lactobacillus brevis* IOEB 9906 possédant les gènes et la capacité de production de la putrescine et négative pour la cadavérine, la tyramine et l’histamine

Les deux dernières souches témoins proviennent de la collection de l’Institut des Sciences de la Vigne et du Vin à l’Université de Bordeaux. Ces amines ont été ciblées car ce sont les principales retrouvées dans les matrices alimentaires fermentées tel que le fromage.

4.3.2. Approche biochimique

Après pré-culture des isolats en bouillon MRS en Deepwell® contenant 0,1% des acides aminés précurseurs (Histidine, Arginine, Lysine, Ornithine ou Tyrosine) ainsi que 0,005% de phosphate de pyridoxal, la détection de la production d’amines biogènes *in vitro* a été évaluée à l’aide d’un milieu amélioré par (Bover-Cid and Holzapfel, 1999) mis au point pour les bactéries lactiques et les entérobactéries. La composition de ce milieu est détaillée dans le tableau 33 ci-dessous. Le pH du milieu a été ajusté à 5,3.

Le milieu a été préparé en autant de versions que d’acides aminés utilisés : Histidine (Acros), Arginine (Fisher), Lysine (Acros), Ornithine (Acros) et Tyrosine (Fisher). Pour chacune des conditions un puits non ensemencé a été utilisé comme témoin négatif.

Après pré-culture des isolats selon les conditions indiquées, le milieu amélioré a ensuite été ensemencé à 1% à partir des pré-cultures puis incubé 24 à 48 heures à 30 °C. La détection de la production d’une amine biogène est effectuée à l’aide du composé pourpre de bromocresol. La présence d’une activité de décarboxylase, ou déiminase dans le milieu (caractéristique de l’activité enzymes produisant les amines biogènes en présence de l’acide aminé correspondant) se traduira par une alcalinisation du pH, faisant virer au violet le milieu de culture.

Tableau 33 : Composition du milieu de culture mettant en évidence le potentiel de production des amines biogènes (Bover-Cid and Holzapfel, 1999)

Composition	g/L
Acide aminé (Histidine, Arginine, Lysine, Ornithine ou Tyrosine)	1
Agar	2
CaCO ₃	0,01
Chlorure de sodium	0,25
Citrate d'ammonium	0,2
Extrait de levure	0,5
Extrait de viande	0,5
FeSO ₄	0,004
Glucose	0,05
K ₂ PO ₄	0,001
MgSO ₄	0,02
MnSO ₄	0,005
Phosphate de pyridoxal	0,005
Pourpre de Bromocrésol	0,006
Tryptone	0,5
Tween 80®	0,1

4.3.3. Approche moléculaire

Une approche moléculaire a également été utilisée pour la détection du gène *agdi* selon (Coton et al., 2010). Un set d'amorces universelles ciblant l'ADNr 16S (BSF8 et BSR1541) était également présent. Les amorces spécifiques utilisées pour cette méthode sont spécifiées dans le tableau 34 ci-dessous.

Tableau 34 : Set de primers utilisées pour la détection des gènes d'amines biogènes par PCR multiplex

Gene	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)	Produit (pb)
<i>agdi</i>	AgD1 (5' CAYGTNGAYGGHSAAGG 3')	AgD2 (5' TGTTGNGTRATRCAGTGAAT 3')	600
<i>16S</i>	BSF8 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')	BSR1541 (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3')	1537

La concentration finale de chacune des amorces était la suivante : 0,8 μ M pour AGDI1, AGDI2, et 0,05 pour BSF8 et BSR1541. Le mix utilisé pour la réalisation de la PCR a été la Dream

Taq Green 2X (ThermoFisher). Un volume final de 15 μ L a ensuite été reparti dans les différents puits et une colonie prélevée à l'aide d'un cône homogénéisée dans chaque puits. Une condition témoin sans colonie dans le mix a également été réalisée. Les conditions de réalisation de la PCR ont été les suivantes :

- 1 cycle à 95°C pendant 5 minutes
- 35 cycles : 1 minute à 95°C, 1 minute à 52°C et 1 minute à 72°C
- 1 extension finale à 72°C pendant 5 minutes

Les produits finaux de PCR ont ensuite été déposés sur gel 1% d'agarose et une électrophorèse réalisée pendant 30 minutes à 100 volts. La visualisation du gel s'est effectuée à l'aide d'une E-box CX5 de chez Vilber.

4.4. Identification des micro-organismes retenus par séquençage de l'ADNr 16S

Une PCR sur colonie a été réalisée pour amplifier le gène codant pour l'ARNr 16S en utilisant les primers universels 616V (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3') et 1492R (5'-GGNTACCTTGTTACGACTT) (Kane et al., 1993; Juretschko et al., 1998). Un mix contenant 15 μ L de master mix (Phusion® High-Fidelity PCR, Fisher Scientific) à concentration 2X, 1,5 μ L de chacune des primers (concentration 0,25 μ M) ainsi que 12 μ L d'eau stérile a été réalisé. Pour chaque isolat testé une portion de colonie a été prélevée à l'aide d'un cône stérile et homogénéisée dans le volume final du mix de 30 μ L. Les témoins négatifs ne contiennent pas de colonie bactérienne. La réaction a ensuite été effectuée à l'aide d'un thermocycleur (Applied Biosystems™ Veriti™ thermal cycler) dans les conditions suivantes :

- 1 cycle à 98 °C pendant 10 minutes
- 35 cycles à : 98 °C pendant 10 secondes, 54 °C pendant 20 secondes et 72 °C pendant 45 secondes
- Une extension finale à 72 °C pendant 5 minutes
- Les produits PCR ont ensuite été déposés dans un gel d'agarose à 1% migrant pendant 30 minutes à 100 Volts. La visualisation s'est effectuée à l'aide d'une E-box CX5 (Vilber).

Le restant des produits PCR ont été envoyés à Eurofins Genomics pour purification et séquençage. L'assemblage des séquences a été réalisé avec le logiciel SeqTrace (Stucky, 2012) et les séquences ADN comparées par Blast grâce à la banque de données du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.5. Innocuité sur modèle *Galleria mellonella*

L'innocuité des isolats appartenant à des espèces non répertoriées dans les listes FIL ou QPS a été testée sur modèle insecte en utilisant des larves de *Galleria mellonella*.

4.5.1. Elevage des larves

Le milieu utilisé pour le maintien des larves contenait, par bocal, 66 g de miel, 66 mL de glycérol (Fluka), 13 g de cire gaufrée (Charozé), 26 g de levure de bière en paillette et 166 g de farine de blé (Carrefour, type 55).

Le miel, glycérol et la cire gaufrée ont dans un premier temps été chauffés dans une casserole. Après homogénéisation, les autres ingrédients sont ajoutés hors du feu. Une pâte de milieu a été formée puis déposée au fond d'un bocal en verre de 10 cm de diamètre (Le Parfait). Après refroidissement, les bocaux étaient prêts à êtreensemencés.

Après avoir été cultivées en milieu riche, 10 larves ont été prélevées par condition puis réparties dans des boîtes de Petri contenant de la cire gaufrée et du pollen. La masse de chaque larve sélectionnée est comprise entre 200 et 250 mg. Les larves sont mises 24 heures à 30 °C.

4.5.2. Préparation des souches, injection et suivi de la mortalité des larves

Les larves ont été transférées dans une boîte de Petri vide et placées sur glace pendant 15 minutes. Cette opération permet d'immobiliser les larves avant injection. La méthode d'injection choisie a été manuelle, et effectuée à l'aide d'une seringue (Terumo® myjector) de 300 µL et d'une éponge permettant de maintenir la larve (Bismuth et al., 2019). Un volume de 10 µL d'une culture ajustée à 10^8 UFC/mL en tampon PBS (phosphate de sodium) a ensuite été injecté à chaque larve au niveau de la 2^{ème} fausse patte postérieure. Du tampon PBS à pH 7,4 a été injecté au groupe témoin négatif et une culture de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 au groupe témoin positif. Les larves ont ensuite été incubées 72 heures à 30°C et un comptage visuel des larves vivantes et mortes, ainsi que la capacité à faire des cocons, évaluée à 0, 24, 48 et 72 heures après injection.

5. Mise au point et sélection des associations des candidats bioprotecteurs

5.1. Mise au point des conditions d'analyse

La méthodologie choisie pour construire les associations repose sur le principe de la méthode de criblage en milieu chimiquement défini liquide. Les différents isolats, ainsi que la souche de *Salmonella* Mbandaka luminescente UCMA 20269^{lux+} ont dans un premier temps été cultivés dans du milieu chimiquement défini lait en Deepwell® à partir d'une colonie puis incubés 24 heures à 30°C. Les suspensions cellulaires des 42 isolats sélectionnées après les criblages ainsi que la souche

de *Salmonella* ont ensuite été ajustés chacun à une concentration finale de 10^6 UFC/mL dans 200 μ L de volume final de milieu chimiquement défini lait en plaque blanche 96 puits. Un suivi de culture a ensuite été réalisé pendant 24 heures avec une mesure de la luminescence toutes les 30 minutes afin de déterminer les temps de lecture adéquats pour la sélection des candidats pour les associations. Chaque expérience a été réalisée trois fois puis la moyenne des résultats a été calculée afin de sélectionner les meilleurs candidats.

5.2. Activité des associations sélectionnées en milieu chimiquement défini lait sur *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+}

A partir de 15 isolats sélectionnés lors des essais préliminaires des associations par deux ont été réalisées avec des concentrations identiques entre la souche de *Salmonella* et le duo d'isolats : 10^6 UFC/mL. Pour cela chacune des suspensions cellulaires des isolats a été ajustée à une concentration de 5.10^6 UFC/mL dans le milieu chimiquement défini, puis 20 μ L ont été repartis dans la plaque 96 puits à fond blanc. Le volume final étant de 200 μ L, chacun des isolats était à concentration finale de 5.10^5 UFC/mL, soit 10^6 UFC/mL pour le duo testé. La suspension cellulaire de la souche de *Salmonella* a été ajustée à une concentration de 10^7 UFC/mL et un volume de 20 μ L a été reparti dans chacun des puits, permettant d'obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/mL. Un suivi de la luminescence a ensuite été effectué pendant 24 heures à 30°C avec une lecture de la luminescence toutes les 30 minutes.

A partir de la sélection de 10 isolats, des associations par trois ont été réalisées. Les conditions ont été les mêmes que pour les associations par deux. Les concentrations ont été ajustées à $3,3.10^6$ UFC/mL pour les isolats, et 10^7 UFC/mL pour la souche de *Salmonella*. Un volume de 20 μ L a ensuite été déposé dans une plaque à fond blanc 96 puits pour chacun des trois isolats composant l'association ainsi que pour *Salmonella* de façon à obtenir une concentration de 10^6 UFC/mL pour la souche de *Salmonella* et pour l'association d'isolats bioprotecteurs. La mesure de la luminescence a été effectuée pendant 24 heures à 30°C toutes les 30 minutes.

5.3. Activité d'associations ternaires en matrice laitière et confrontation avec des souches de *Salmonella* de terrain

L'activité inhibitrice de sept associations finalement retenues a ensuite été testée contre cinq souches de terrain de *Salmonella* : *S.* Mbandaka UCMA 17915, *S.* Mbandaka UCMA 19917, *S.* Mbandaka UCMA 20264, *S.* Montevideo UCMA 19840 et *S.* Ohio UCMA 19862. Dans un premier temps des pré-cultures ont été réalisées dans 5 mL de milieu BHI pour les isolats et en milieu LB

pour *Salmonella*, incubés à 30°C et 37°C respectivement pendant 24 heures. Les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 4 149 xg et le culot resuspendu dans 5 mL de tryptone sel. La concentration finale des associations dans du lait demi-écrémé reconstitué a été ajustée à 10⁶ UFC/mL. Les tubes ont ensuite été incubés à 30°C pendant 24 heures. Un dénombrement des *Salmonella* sur gélose XLD a été effectué à 0 et après 24 heures d'incubation à 37°C et comparé au témoin ne contenant aucune association.

6. Vérification de la non-inhibition des ferments et de leurs activités par les souches sélectionnées

Deux types de vérifications ont ici été réalisés. La capacité d'acidification des ferments lactiques (testés en l'état) habituellement utilisés par la fromagerie partenaire en présence des isolats sélectionnés et d'autre part l'absence d'inhibition sur les autres ferments (affinage, protecteurs...) par les isolats sélectionnés. Ces ferments correspondent à ceux employés dans l'atelier dans lequel les fabrications pilotes ont été réalisées.

6.1. Ferments utilisés par les fromageries dans cette étude

Des souches issues des ferments utilisés en transformation fromagère ont été testées afin d'étudier la non inhibition de ces ferments par les candidats sélectionnés. Le tableau 35 ci-dessous répertorie les différents ferments ainsi que leur composition en bactéries et/ou levures et moisissures.

Tableau 35 : Liste et composition des différents ferments testés dans le cadre de cette étude

Ferments	Composition bactérienne des différents ferments industriels		
Ferment d'affinage 1	<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	<i>Arthrobacter nicotianae</i> (<i>Glutamicibacter nicotianae</i>)	<i>Geotrichum candidum</i>
Mélange de ferments lactiques mésophiles 1	<i>L. subsp. lactis</i>	<i>L. lactis subsp. cremoris</i>	<i>L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>		
Mélange de ferments lactiques mésophiles 2	<i>L. lactis subsp. cremoris</i>	<i>L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>L. lactis subsp. lactis</i>
Ferment d'affinage 2	<i>Geotrichum candidum</i>		
Ferment d'affinage 3	<i>Geotrichum candidum</i>		
Flore protectrice 1	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
Ferment d'affinage 4	<i>Kluveromyces lactis</i>		
Ferment d'affinage 5	<i>Penicillium camemberti</i>		
Ferment d'affinage 6	<i>Staphylococcus xylosum</i>		
Flore protectrice 2	Confidentiel		

6.2. Impact sur l'acidification en milieu lait et croissance des bactéries d'affinage et des flores de bioprotection

Les ferments acidifiants « Mélange de ferments lactiques mésophiles 1 et 2 » ainsi que la « Flores protectrices 1 » ont été cultivés dans 250 mL de lait demi-écrémé reconstitué (Difco) à une concentration de 1 dose de ferment/1000L de lait, et une mesure du pH (Metrohm 827) a été effectuée à 0, 2, 18 et 24 heures de croissance. En parallèle, cette culture a été réalisée avec en plus l'ajout des isolats bioprotecteurs sélectionnés, à partir d'une colonie. Après 24 heures à 30°C les mesures de pH ont été comparées à celles des ferments seuls en l'absence des différents isolats. Les isolats sélectionnés ont été testés avec les trois types de ferments.

Pour les moisissures et les levures (Ferments d'affinage 2, 3, 4 et 5), des pré-cultures en bouillons TSB-YE ont été réalisées et incubées 2 à 5 jours à 25°C. Après incubation un isolement en surface sur gélose inclinée TSA-YE a été effectué puis incubé à 25°C jusqu'à apparition de colonies.

Pour les bactéries, les ferments d'affinage 6 ainsi que la flore protectrice 2 ont été cultivés en bouillon TSB-YE à 30 °C pendant 24 heures. Le ferment d'affinage 1 a été cultivé en milieu liquide TSB-YE pendant 24 heures à 30 °C puis repiqué sur gélose TSA-YE afin de séparer les trois types de micro-organismes présents dans le mélange. Après repiquage des colonies, les isolats de *Brevibacterium aurantiacum* ainsi que de *Glutamicibacter nicotianae* ont été cultivés séparément en bouillon TSB-YE et la levure *Geotrichum candidum* repiquée sur gélose inclinée TSA-YE. Les bactéries et la levure ont été incubées à 25°C.

L'évaluation de l'inhibition des isolats sur les ferments a été faite à l'aide de la méthode par double couche (Hockett and Baltrus, 2017). Les ferments bactériens ont été ensemencés en masse à DO₆₀₀ de 0,01 en gélose TSA-YE. Après 15 min de séchage, 2,5 µL de culture de nuit des isolats ont été déposés à la surface et incubés 24 heures à 30°C. Pour les ferments fongiques une suspension à l'aide d'eau physiologique a été réalisée à partir des géluses inclinées. Trois écouvillonnages successifs de cette suspension ont ensuite été réalisés sur gélose TSA-YE, et après séchage, 2,5 µL de culture de nuit de chacun des isolats ont été déposés par-dessus. Les géluses ont été incubées 1 à 5 jours à 25°C. La lecture s'est ensuite effectuée à l'œil nu en observant la présence ou l'absence d'un halo d'inhibition.

7. Validation des associations en fromage

7.1. Validation des activités anti-*Salmonella* des associations en matrice laitière et fromagère en laboratoire

Le dénombrement sélectif des *Salmonella* en matrice lait cru et fromage étant impossible à cause des autres *Enterobacteriaceae* présentes dans la matrice, la validation de l'activité anti-*Salmonella* s'est effectuée avec l'utilisation d'une souche résistante à l'ampicilline. Le milieu sélectif XLD a été supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) afin de ne sélectionner que la souche résistante CIP 105.859 et inhiber un maximum les autres micro-organismes présents dans le lait cru capables de pousser sur milieu.

L'activité anti-*Salmonella* des associations contre la seule souche résistante à l'ampicilline, CIP 105.859, a été dans un premier temps effectué en lait écrémé de la même manière qu'en § 5.3 p 113).

7.1.1. Etude de l'activité anti-*Salmonella* en lait maturé

L'activité anti-*Salmonella* des associations en matrice laitière a été évaluée. Pour cela 5 mL de lait cru de mélange après maturation primaire, avec et sans les associations, ont étéensemencés avec la souche de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 résistante à l'ampicilline. Le lait maturé a étéensemencé à une concentration de 10^3 UFC/mL puis incubé pendant 24 heures à 30°C. Après incubation une gamme de dilutions décimales dans du PBS a été effectuée et un ensemencement en surface sur gélose XLD contenant 100 µg/mL d'ampicilline a été réalisé. Après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C le dénombrement des *Salmonella* a été réalisé et comparé au témoin sans associations. Pour chaque condition trois tubes ont étéensemencés. La moyenne des dénombrements obtenus ainsi que l'écart-type ont ensuite été déterminés pour chaque association.

7.1.2. Etude de l'activité anti-*Salmonella* sur caillé

L'analyse a été réalisée à partir de caillés issus des fabrications pilotes, prélevés à J+2, et ce pour chacun des lots d'essais (trois associations) et témoin (lait sans association). Pour cela cinq fromages de chaque lot d'essai (associations et témoin) ont été broyés ensemble puisensemencés à une concentration de 10^3 UFC/g avec *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859. Les broyats ont ensuite été répartis dans cinq boîtes de Petri de manière homogène (environ 10 g/boîte de Petri) et incubés à 13°C et 98% d'humidité relative dans une enceinte climatique (type, fournisseur) pendant 14 jours permettant de mimer l'affinage. Des analyses ont ensuite été effectuées à 0, 2, 5, 7 et 14 jours après incubation.

Pour chaque point d'analyse l'ensemble du broyat a été prélevé puis dilué au dixième dans de l'eau peptonée tamponnée à l'aide d'un Stomacher®. Une gamme de dilutions décimales a été réalisée en PBS et utilisée pour ensemencer des géloses XLD + ampicilline, ensuite incubées à 37°C. Le dénombrement a été effectué après 24 et 48 heures d'incubation.

7.1.3. Etude de l'activité anti-*Salmonella* en mini Camembert en laboratoire

L'étude de l'activité anti-*Salmonella* a également été évaluée lors de l'ajout des associations dans du lait de grand mélange (prélevé juste avant maturation primaire). L'objectif ici était de reproduire plusieurs étapes du processus de fabrication (maturation primaire, maturation secondaire, affinage) afin d'allonger le temps de contact entre *Salmonella* et les associations. Afin de ne pas introduire de pathogène dans la fromagerie, ces expériences ont été effectuées en laboratoire. Pour cela du lait cru de mélange contenant déjà tous les ferments a étéensemencé avec les différentes associations à concentration finale 10^6 UFC/mL ainsi qu'avec *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 à

concentration 10^3 UFC/mL. Le lait a ensuite été maintenu à 13°C pendant 16 heures puis réchauffé à 35°C. Une fois à température, la présure a été ajoutée à concentration 190 μ L/L. Le temps de coagulation a été de 1h15 à 35°C. Le caillé a ensuite été tranché fois tous les 2 cm verticalement à l'aide d'un couteau stérile, dans deux plans perpendiculaires. Le moulage a été réalisé en une seule fois dans des moules à faisselles et le caillé mis à égoutter 16 heures à 20°C. Le lactosérum a été retiré puis les caillés démoulés et salés (1 g/100g). Une seconde étape d'égouttage a été réalisée à 18°C pendant 24 heures. Pour chaque association l'ensemble des mini fromages ont été broyés à l'aide d'un Smasher® et 10 g de broyat ont répartis dans des boîtes de Petri et incubés à 13°C sous 98% d'humidité relative en enceinte climatique. Les mêmes procédures d'analyses qu'en section 7.1.1 et 7.1.2 ont ensuite été effectuées.

7.2. Préparation et contrôle qualité des associations bioprotectrices utilisées pour les fabrications pilotes

7.2.1. Milieux de culture

Les différents milieux prêts à l'emploi (bouillons et géloses) utilisés pour le contrôle qualité des cultures bioprotectrices ont été notés dans le tableau 36 ci-dessous.

Tableau 36 : Milieux de cultures utilisés pour le suivi des contrôles qualité des cultures bioprotectrices

Micro-organisme testé	Milieu d'enrichissement	Milieu d'isolement sélectif ou de dénombrement	Norme
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fraser au demi (Oxoid)	Oxford (Oxoid)	ISO 11290-1 et 2
	Fraser (Oxoid)	Gélose <i>Listeria</i> selon Ottaviani et Agosti (ALOA, Fisher Scientific™)	
<i>Salmonella</i>	Eau peptonée tamponnée (Oxoid)	Xylose Lysine Désoxycholate (XLD, Fisher Scientific™)	ISO 6579-1:2017
	Rapport Vassiliadis Soja (RVS, Thermofisher Scientific™)		
	Müller-Kauffmann au tétrathionate et Novobiocine (MKTTn, Oxoid)	Hektoen (Oxoid)	
Enterobactéries		Gélose glucosée biliée au cristal violet et rouge neutre (VRBG, Oxoid)	ISO 21528-2
Staphylocoques à coagulase positive		Baird-Parker plus plasma de lapin et fibrinogène (BP + RPF, Oxoid)	NF ISO 6888-2/A1
Levures et moisissures		Oxytétracycline glucose et extrait de levure (OGYE)	ISO 7954:1987

7.2.2. Méthodologie

Chacun des isolats sélectionnés a été cultivé dans 5 mL de milieu BHI à partir d'une colonie fraîche puis incubé 16 heures à 30°C. A partir de ces pré-cultures, des erlenmeyers stériles de 250 mL contenant 150 mL de bouillon BHI ont été ensemencés à 1% pour chacun des isolats puis mis sous agitation à 120 rpm (IKA® KS 4000 i), 30°C pendant 24 heures. Après incubation, le volume calculé pour chaque isolat permettant d'obtenir une concentration finale dans la bassine de $3,3 \cdot 10^5$ UFC/mL a été centrifugé 15 minutes à 4 149 g dans des falcons stériles de 50 mL. Après élimination du surnageant, le culot a été lavé deux fois dans 20 mL de tryptone-sel (TS) puis les culots ont été resuspendus dans 2 mL de lait demi-écrémé du commerce. Les trios d'associations ont ensuite été constitués à partir des culots resuspendus puis le volume complété à 20 mL avec du lait demi-écrémé. La concentration finale des associations dans les bassines était donc de 10^6 UFC/mL (chaque souche à 1/1/1).

Un témoin négatif correspondant à du lait non ensemencé a été réalisé. Les différents contrôles qualité ont ensuite été effectués :

- Pour *Listeria monocytogenes* un enrichissement primaire a été réalisé en ajoutant 25 mL de lait ensemencé dans 225 mL de bouillon Fraser au demi. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, un isolement sur gélose Oxford et ALOA ainsi qu'un enrichissement secondaire ont été réalisés. Pour l'enrichissement secondaire 100 µL d'enrichissement primaire ont été ajoutés dans 10 mL de bouillon Fraser. Après incubation 24 heures à 37°C deux autres isolements sur gélose Oxford et ALOA ont été effectués. La lecture des milieux gélifiés a été effectuée après 24 et 48 heures.
- Pour *Salmonella* un pré-enrichissement a été effectué en ajoutant 25 mL de lait ensemencé ou non ensemencé dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée. Après 20 heures d'incubation à 37°C deux enrichissements ont été réalisés : un en bouillon RVS (0,1 mL) et un en milieu MKTTn (1 mL). Après incubation à 41,5°C pour le premier et 37°C pour le second pendant 24 heures, deux isolements ont été effectués sur géloses Hektoen et XLD puis incubés à 37°C pendant 24 heures.
- Le contrôle qualité pour les entérobactéries a été réalisé en ensemencant en double couche une gélose VRBG avec la dilution -1. La recherche de colonies caractéristiques a été effectuée après 24 heures d'incubation à 30°C.
- Le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive a été réalisé en ensemencant en surface une gélose Baird-Parker + RPF puis en effectuant une lecture à 18, 24 et 48 heures après incubation à 37°C (ISO/DIS 6888-1).

- Pour les levures et les moisissures un ensemencement en masse de 1 mL en gélose OGYE a été effectué. Des lectures ont été effectuées pendant les 5 jours d'incubation à 25°C.

7.3. Analyses des fabrications fromagères

7.3.1. Analyses microbiologiques

Après validation des contrôles qualités, les associations resuspendues dans du lait ont été ajoutées au lait de mélange à une concentration finale de 10^6 UFC/mL. La figure 19 représente les différentes étapes réalisées pour ces transformations.

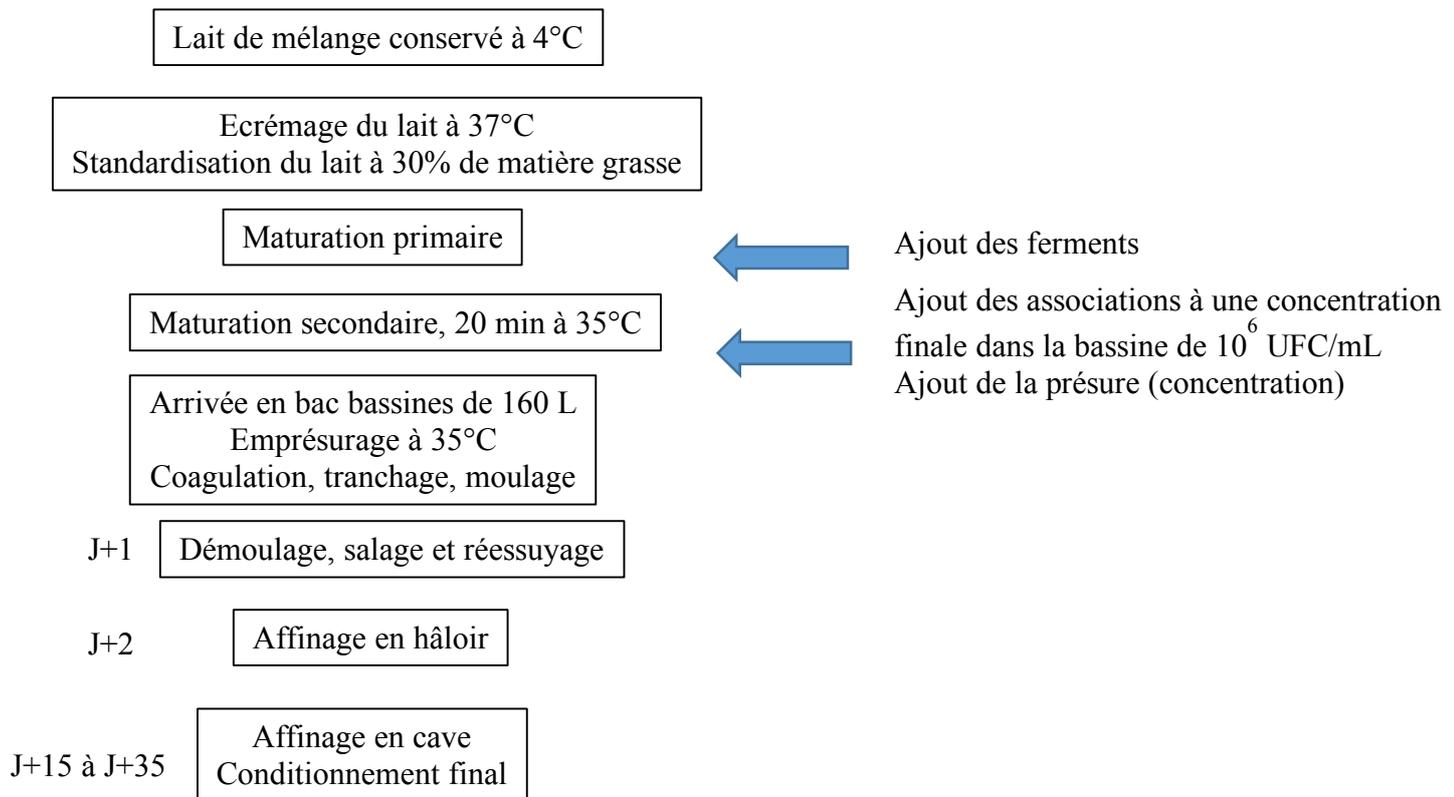


Figure 19 : Procédé de fabrication du Camembert au lait cru mécanisé

Pour les analyses bactériennes et fongiques, un échantillon moyen de cinq fromages a été analysé par association. Environ 4 g de matière ont été prélevés par fromage (cœur et croûte) soit un total de 20 g, puis mélangés dans 180 g de K_2HPO_4 à 2% (pH 7,4 - 7,6) à l'aide d'un Smasher®. Une gamme de dilutions décimales a ensuite été effectuée dans du diluant tryptone-sel (TS) puis les différentes géloses ont été ensemencées en surface et incubées aux températures adéquates. Le lait de mélange, testé en triplicata, a directement été dilué en TS puis analysé de la même manière.

Différents milieux de cultures ont été utilisés pour le suivi des différents micro-organismes et sont répertoriés dans le tableau 37 ci-dessous.

Tableau 37 : Milieux et conditions de culture utilisés pour le dénombrement des différents micro-organismes

Milieu de culture	Micro-organisme mis en évidence	Conditions de culture	Référence/ Norme
PCAi (Plate Count Agar inhibitor)	Bactéries à Gram négatif	30°C, 48 heures	(Callon et al., 2007)
MRSi (de Man Rogosa et Sharpe inhibitor) + acide nalidixique + natamycine	Bactéries lactiques	30°C, 72 heures	(Monsallier et al., 2016)
OGYE (Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar)	Flore fongique (levures et moisissures)	25°C, 3 à 5 jours	ISO 7954:1987
CRBM (Cheese Ripening Bacteria Medium)	Bactéries d'affinage (<i>Staphylococcaceae</i> et <i>Actinobacteria</i> aérobies)	25°C, 5 jours	(Denis et al., 2001)

Les géloses MRSi et CRBM ont été préparées en ajoutant une solution d'acide nalidixique (Alfa Aeser, 0,4%) ainsi qu'une solution de de natamycine (0,9%). Les deux solutions ont été ajoutées après autoclavage des géloses à une température de 50°C.

La gélose PCAi a été préparée en ajoutant 1% (v/v) de lait écrémé reconstitué à 10%, de 0,05% cristal violet (10 mg/mL), de 0,1% vancomycine (5 mg/mL) et de natamycine à 0,9%. Les solutions ont été ajoutées après autoclavage des géloses à une température de 50°C.

La solution de natamycine (Alfa Aeser) a été préparée à 0,9% dans du DMSO puis ajoutée à hauteur de 2 mL/L. L'utilisation de cette solution est immédiate et elle ne se conserve pas.

La solution d'acide nalidixique (Sigma) a été préparée à 0,4% dans du DMSO. Elle a ensuite été ajoutée à hauteur de 10 mL/L. Cette solution se conserve 1 mois à température ambiante.

Les bases gélosées PCA (Biokar), MRS (Biokar) et OGYE (Oxoid) ont été préparées à partir de poudres. Le supplément d'oxytétracycline (Oxoid) a été ajouté après autoclavage de la gélose OGYE, et à une température de 50°C. La gélose CRBM a été réalisée à l'aide de 5 g/L de K₂HPO₄ (Acros), 33,4 g/L de solution de D,L-lactate de sodium à 60% (Sigma), 2 g/L MgSO₄, 10 g/L peptone de caséine (Biokar), 7 g/L d'extrait de levure (Biokar), 50 g/L de NaCl (Fisher), 1 g/L de Tween 80 (Sigma) et 15 g/L d'agar (Biokar).

7.3.2. Suivi pH, extrait sec et protéolyse

Le tableau 38 énumère les différentes analyses effectuées au cours du processus de fabrications des fromages. Les analyses de pH et d'extrait sec ont été réalisées sur place dans la fromagerie.

L'analyse du pH a été effectuée selon la norme AFNOR FD V 04-035 en mélangeant 10 g de broyat de fromage avec 50 mL d'eau distillée. Une fois le contenu homogénéisé à l'aide d'un agitateur et la matière grasse éliminée, la mesure du pH est effectuée à l'aide d'un pH-mètre InoLab.

L'analyse de l'extrait sec a été effectuée à l'aide du FoodScanTM 2 (Foss). Pour cela un fromage a été broyé puis 50 g ont été placés dans une boîte de Petri. La surface a été égalisée à l'aide d'une spatule et la mesure effectuée en sélectionnant sur l'appareil le type de matrice à analyser.

L'analyse de la matière azotée non protéique a été réalisée par un prestataire (Eurofins analytics) selon la méthode : ISO 8968-4:2016/IDF et l'azote total par une méthode interne Kjeldahl (Titrimétrie).

Tableau 38 : Répartition des différentes analyses effectuées au cours du suivi des fabrications

Analyse	Lait de mélange	J+2	J+7	J+21	J+35	J+65
Mesure du pH	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Détermination de l'extrait sec		✓	✓	✓	✓	✓
Azote total et azote non protéique		✓	✓	✓	✓	✓
Dénombrement de la flore fongique (OGA)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dénombrement des bactéries d'affinage (CRBM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dénombrement des bactéries lactique (MRSi)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dénombrement des bactéries à Gram négatif (PCAi)	✓	✓	✓	✓	✓	✓

7.4. Evaluation de l'impact des associations sur les qualités organoleptiques des Camemberts au lait cru mécanisé

Une dégustation à l'aveugle des fromages à J35 et J65 a été effectuée par quatre dégustateurs à la fromagerie afin d'évaluer l'aspect et les qualités organoleptiques des fromages avec et sans les associations. Les points suivants ont été comparés par rapport au standard de la fromagerie : affinage, aspect, texture, persillage et goût.

8. Schéma récapitulatif de la méthodologie globale de cette étude

Mise en évidence de candidats en tant qu'agents bioprotecteurs contre *Salmonella enterica*

Partie 1 Sélection d'isolats ayant une activité anti-*Salmonella* par mécanisme d'amensalisme et/ou d'antibiose

Mise au point d'une méthode de criblage permettant d'évaluer le potentiel anti-*Salmonella* d'un grand nombre d'isolats en matrice laitière et fromagère

Miniaturisation en plaque 96 puits de la méthode en double couche utilisée classiquement pour un criblage

Mise au point de milieux de culture adéquats dans le cadre de l'étude et représentatifs de la matrice laitière et fromagère

Optimisation de la méthode par l'utilisation d'outils permettant un criblage plus rapide : deepwell et replicateur

Utilisation d'un indicateur coloré redox permettant une lecture qualitative rapide

Partie 2 Sélection d'isolats ayant une activité anti-*Salmonella* par mécanisme de compétition par interaction en milieu liquide

Caractérisation des potentiels enjeux de compétition nutritionnelle chez *Salmonella*

Etude des sources carbonées utilisées chez *Salmonella* et analyse de la consommation en matrice laitière

Mise au point de deux milieux synthétique mimant la composition de la matrice laitière et fromagère

Mise au point d'une méthodologie permettant le suivi de la croissance de *Salmonella* en co-culture avec les isolats à cribler

Transformation de souches de *Salmonella* pour les rendre luminescentes lorsqu'elles sont métaboliquement actives

Validation de la stabilité du transposon ainsi que de la lecture en temps réel de la luminescence

Mise en place de la méthode de criblage en milieu synthétique avec les souches de *Salmonella* transformées

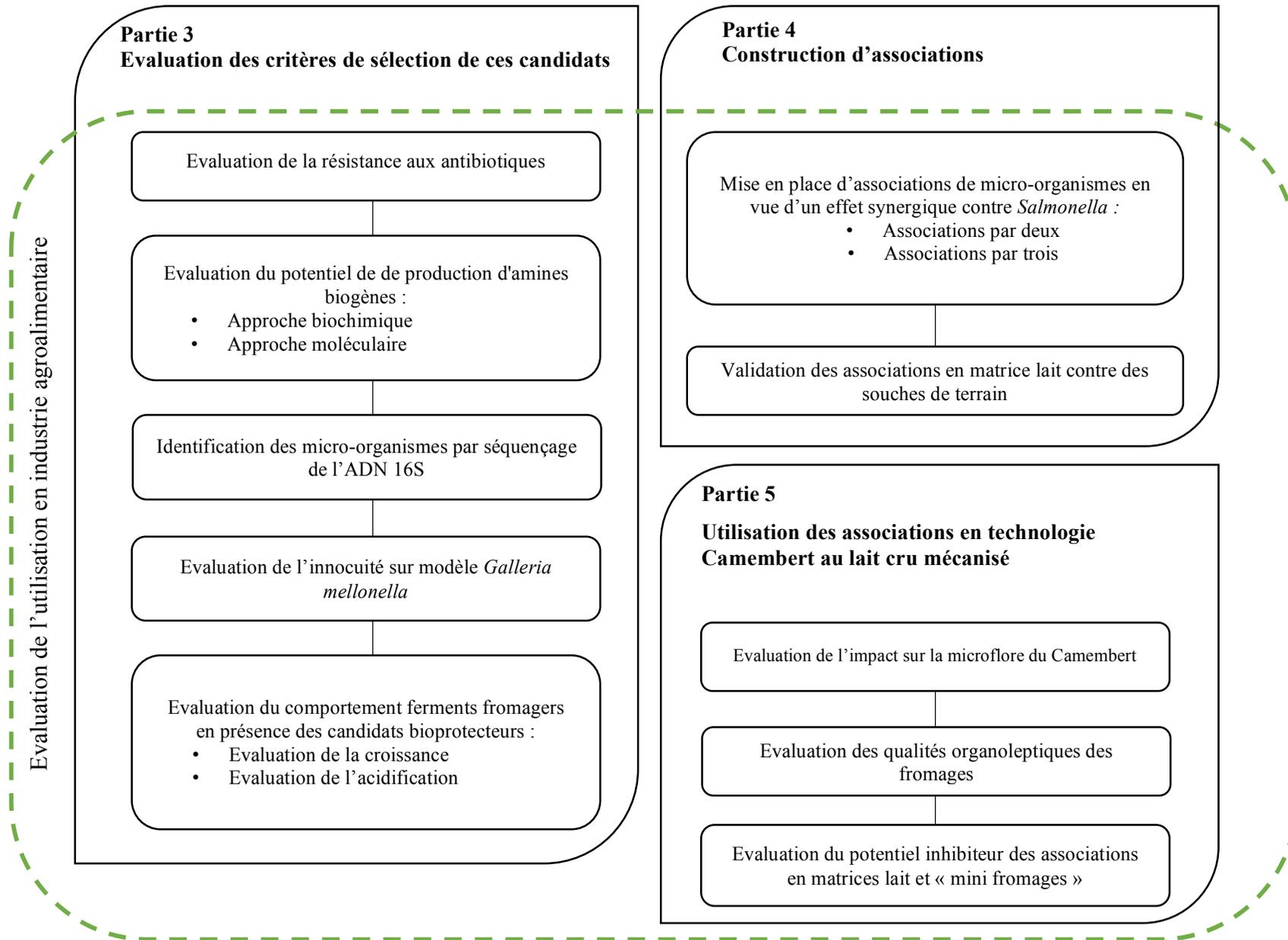


Figure 20 : Schéma récapitulatif de la méthodologie globale

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE II : Résultats et discussion

1. Méthode de criblage par amensalisme et/ou antibiose

1.1. Validation de la méthode de criblage par amensalisme et/ou antibiose

Pour la validation des conditions de criblage, trois isolats de genres bactériens différents et ayant une activité antagoniste connue contre la souche de référence *Salmonella enterica* sérovar Newport CIP 105.629 ont été utilisés. Les isolats sélectionnés étaient *Aerococcus urinaeequi* UCMA 5972 (potentielle production de biosurfactant), *Pseudomonas lundensis* UCMA 7402 et *Pediococcus parvulus* UCMA 16814 (potentielle production de bactériocine). La nature précise des molécules produites n'est néanmoins pas connue.

Trois milieux de culture classiques ont été testés pour la mise au point de la méthodologie : le BHI, le MRS et le M17. L'objectif était de déterminer le milieu adéquat pour la croissance d'un grand nombre bactéries, appartenant majoritairement à la famille des bactéries lactiques. Suite à l'observation d'une croissance trop faible ou non détectable de l'isolat d'*Aerococcus*, les milieux MRS et M17 ont été écartés. La mise au point de la méthode s'est donc effectuée à l'aide du milieu gélosé BHI. En effet, bien que considéré comme non optimal dans la littérature pour la croissance des bactéries lactiques, il a permis de faire pousser de manière homogène les trois témoins.

Pour la surcouche, le milieu LB a été sélectionné afin d'offrir un milieu approprié plus spécifiquement pour la croissance du genre *Salmonella* avec une incubation à 30°C (température retenue dans le cadre de cette étude). Afin de déterminer le volume de surcouche adéquat, une gamme allant de 50 à 100 µL a été évaluée. Le volume idéal retenu a été ici de 70 µL. En effet des volumes inférieurs ne permettaient pas d'obtenir une couche de gélose recouvrant correctement l'ensemble de la première couche gélosée mais également suffisamment épaisse pour éviter une diffusion trop rapide de la résazurine.

La capacité de la résazurine à révéler l'activité métabolique de *Salmonella* après incubation, a été évaluée à différents temps d'action et dans deux diluants (tampon phosphate salin ou eau distillée). A pH supérieur à 6,5, la résazurine de couleur bleue est réduite en présence de cellules métaboliquement actives en résosfurine de couleur rose. Le pH du milieu pouvant être abaissé dans le cas d'un criblage de bactéries lactiques (production d'acides organiques), il a été nécessaire d'utiliser la résazurine diluée dans du PBS afin de tamponner le milieu durant l'action de celle-ci. Le temps de contact avant lecture a été déterminé de manière visuelle. Ce temps correspond à la diffusion complète de la résazurine dans la couche supérieure de gélose jusqu'à atteinte du spot de l'isolat criblé (alors coloré en rose). Dans ces conditions d'analyse, le temps d'action optimal de la résazurine a ainsi été évalué à 5 min à température ambiante.

Les résultats obtenus dans ces conditions d'analyse pour les trois isolats antagonistes sont représentés dans la figure 21 ci-dessous. La première ligne représente les essais avec *Salmonella* en contact avec les isolats (triplicata). Sur la seconde ligne (témoins), les trois premiers puits représentent les souches seules sans *Salmonella*, les trois suivants représentent *Salmonella* seule dans la double couche, et les trois derniers puits du milieu stérile (première et seconde couche de gélose).

La lecture de l'inhibition s'effectue de manière qualitative : un puit de couleur rose va traduire une chaîne respiratoire fonctionnelle et donc une souche métaboliquement active. Un puit bleu traduira l'absence de fonctionnement de cette chaîne respiratoire. L'activité inhibitrice des isolats testés (ligne 1) contre *Salmonella* CIP 105.629 est retrouvée puisque les puits restent bleus en comparaison avec le témoin dans lequel le pathogène est actif (puits roses). La présence d'un halo rose dans le fond du puits correspond ici à la détection du spot bactérien de l'isolat criblé mais reste différenciable d'un puits positif (inhibition de *Salmonella*).

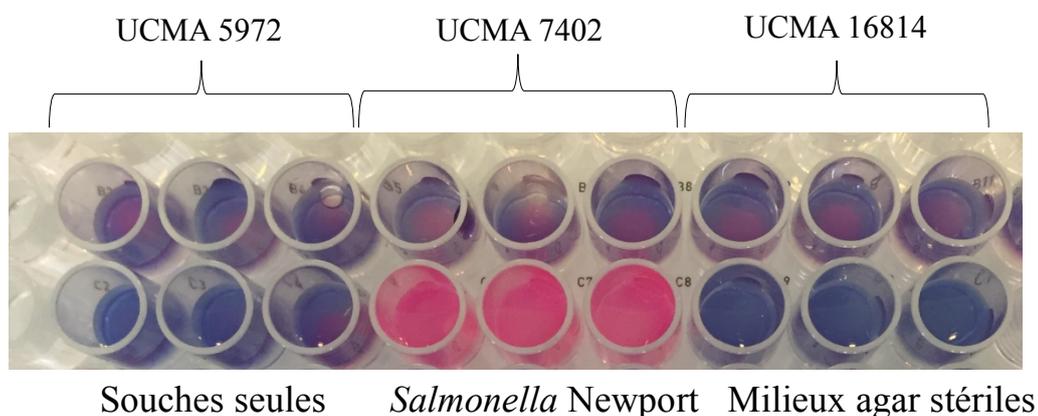


Figure 21 : Evaluation de l'inhibition de trois isolats contre *Salmonella* Newport CIP 105.629 en milieu BHI

Cette méthode a ensuite été appliquée avec les mêmes isolats mais dans des conditions permettant de se rapprocher des conditions physicochimiques rencontrées durant la maturation secondaire du lait (gélose opaque au lait, pH 6,3, 30°C) et durant la seconde partie d'affinage (gélose opaque au fromage, pH 6,8, 15°C). Les mêmes résultats furent obtenus qu'avec le milieu BHI agar.

La nature des molécules inhibitrices produites par les trois isolats n'étant pas connue, le peroxyde d'hydrogène (1 mM) et l'acide DL-lactique (850 mM) ont également été testés à des concentrations inhibitrices précédemment déterminées correspondant à la CMI de la souche de *Salmonella* Newport CIP 105.629 testée. La mise en évidence de l'inhibition sur la souche de *S. Newport* a également été observée dans les deux conditions.

Tout comme la méthodologie classique de l'agar spot assay majoritairement utilisée pour les criblages (Bevilacqua et al., 2003), cette méthode repose sur la capacité de production de composés inhibiteurs d'une souche. Elle s'effectue en deux étapes, la première étant la croissance de l'isolat et la production du/des composé(s) et la seconde repose sur la diffusion de ce/ces composés à travers la seconde couche de gélose contenant le pathogène à inhiber.

L'avantage de la méthode développée ici par rapport à la méthode classique de l'agar spot assay, est qu'elle peut aussi bien être utilisée avec des milieux classiques (BHI, MRS) qu'avec des milieux plus complexes et surtout opaques (ici milieu agar lait et fromage). Cette méthode permet également de moduler des conditions de culture des isolats à cribler ou des pathogènes. Cette optimisation et miniaturisation de la technique classique représente un avantage dans le cadre de criblages larges et nécessitant des conditions de culture et des matrices complexes.

L'utilisation de la résazurine comme indicateur permet ici une lecture qualitative et rapide de la plaque. Si la résazurine est majoritairement utilisée dans l'évaluation de la croissance de cellules eucaryotes (O'Brien et al., 2000), elle peut être transposée aux bactéries. En effet une autre étude utilisant cet agent oxydo-réducteur pour le contrôle de la croissance de bactéries en milieu liquide a mis en évidence l'utilité et la praticité de son utilisation (Sarker et al., 2007). De par sa lecture visuelle la résazurine permet une mise en évidence rapide des cellules et donc un gain de temps dans un contexte de criblage rapide.

1.2. Criblage de candidats bioprotecteurs

La figure 22 représente la répartition des isolats actifs et non actifs en fonction de leurs genres. Seuls les isolats ayant démontré une activité sur les deux essais réalisés ont été retenus. Sur les 1 450 isolats criblés sur les milieux gélosés BHI, lait et fromage contre les trois souches de référence *S. Mbandaka* CIP 105.859, *S. Montevideo* CIP 104.583 et *S. Newport* souche CIP 105.629, 447 (31%) ont montré une activité antagoniste sur au moins un des trois milieux et contre au moins une souche de *Salmonella*.

Parmi les isolats actifs la majorité font partie du genre *Lactococcus* avec 219 isolats actifs, soit plus de 48% des isolats actifs. Ce fort pourcentage peut être expliqué par deux aspects : le fort potentiel inhibiteur de ce genre largement décrit dans la littérature ainsi que sa grande proportion dans le criblage. Si l'on regarde les isolats actifs par rapport au nombre d'isolats criblés le genre *Aerococcus* sort du lot car sur les 31 isolats criblés 29 ont montré une activité inhibitrice. Cela traduit un fort potentiel anti-*Salmonella* de ce genre bactérien. Viennent ensuite les genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* avec respectivement 44 et 43 isolats actifs soit presque 10% parmi le nombre total

d'isolats actifs. D'autres micro-organismes actifs tels que les *Actinobacteria* et les *Staphylococcaceae* mais aussi des bactéries à Gram négatif et des levures sont retrouvés.

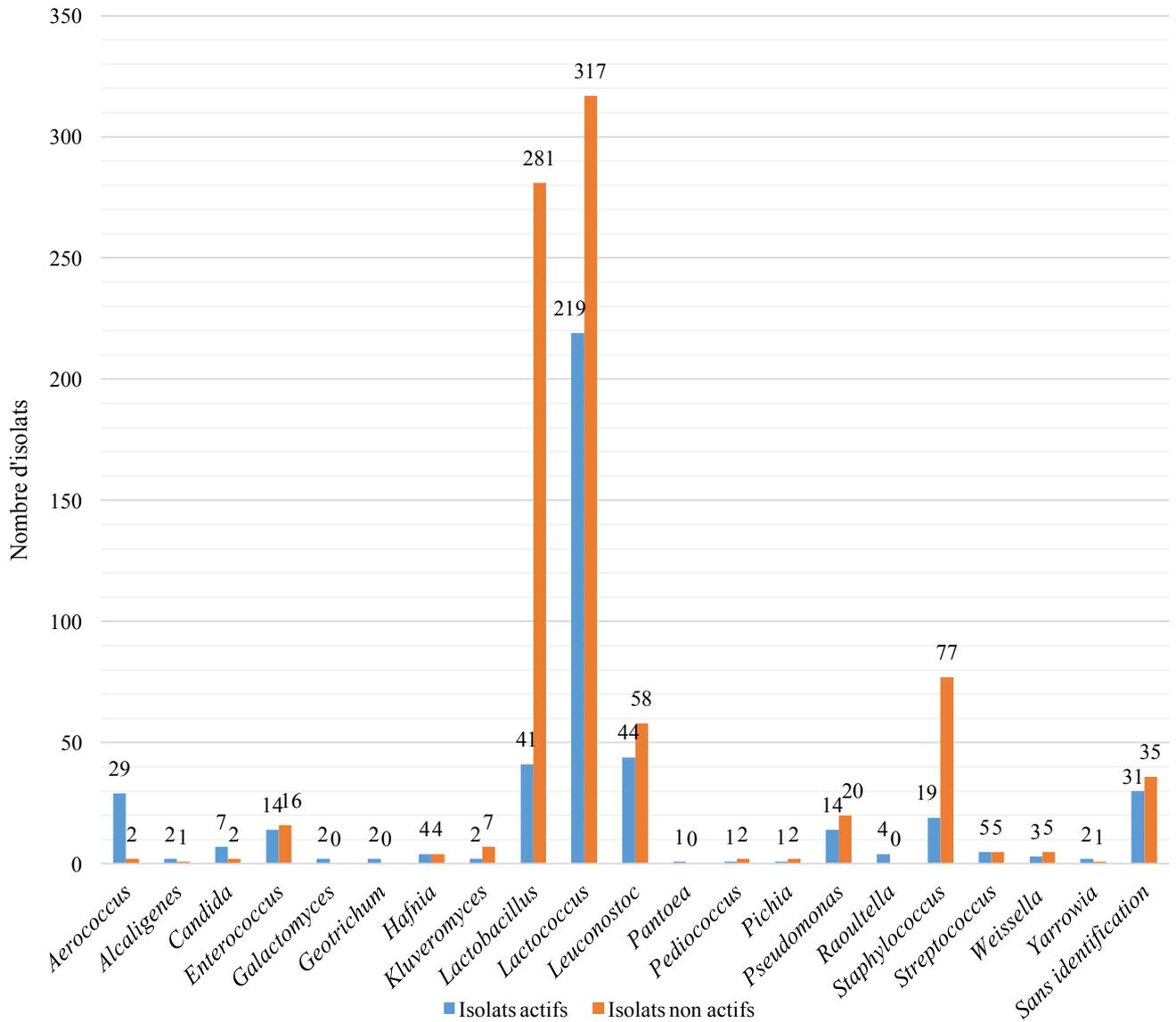


Figure 22 : Répartition des isolats actifs en fonction de leur genre

En milieu riche BHI, 134 isolats (soit 8,5%) ont été capables d'inhiber au moins une des trois souches de *Salmonella*. La figure 23 représente l'activité sur les différentes souches. Parmi les isolats criblés, 6 (0,4%) ont une activité inhibitrice uniquement contre la souche CIP 104.583 du sérovar Montevideo, 13 (0,9%) contre la souche CIP 105.859 du sérovar Mbandaka et 42 (2,9%) contre la souche CIP 105.629 du sérovar Newport. La souche du sérovar Newport semble la plus sensible et Montevideo la moins sensible. Si l'on regarde les isolats capables d'inhiber plusieurs

souches sur milieu BHI, 50 isolats (soit 3,4%) sont capables d'inhiber deux souches et 24 (1,6%) les trois souches testées.

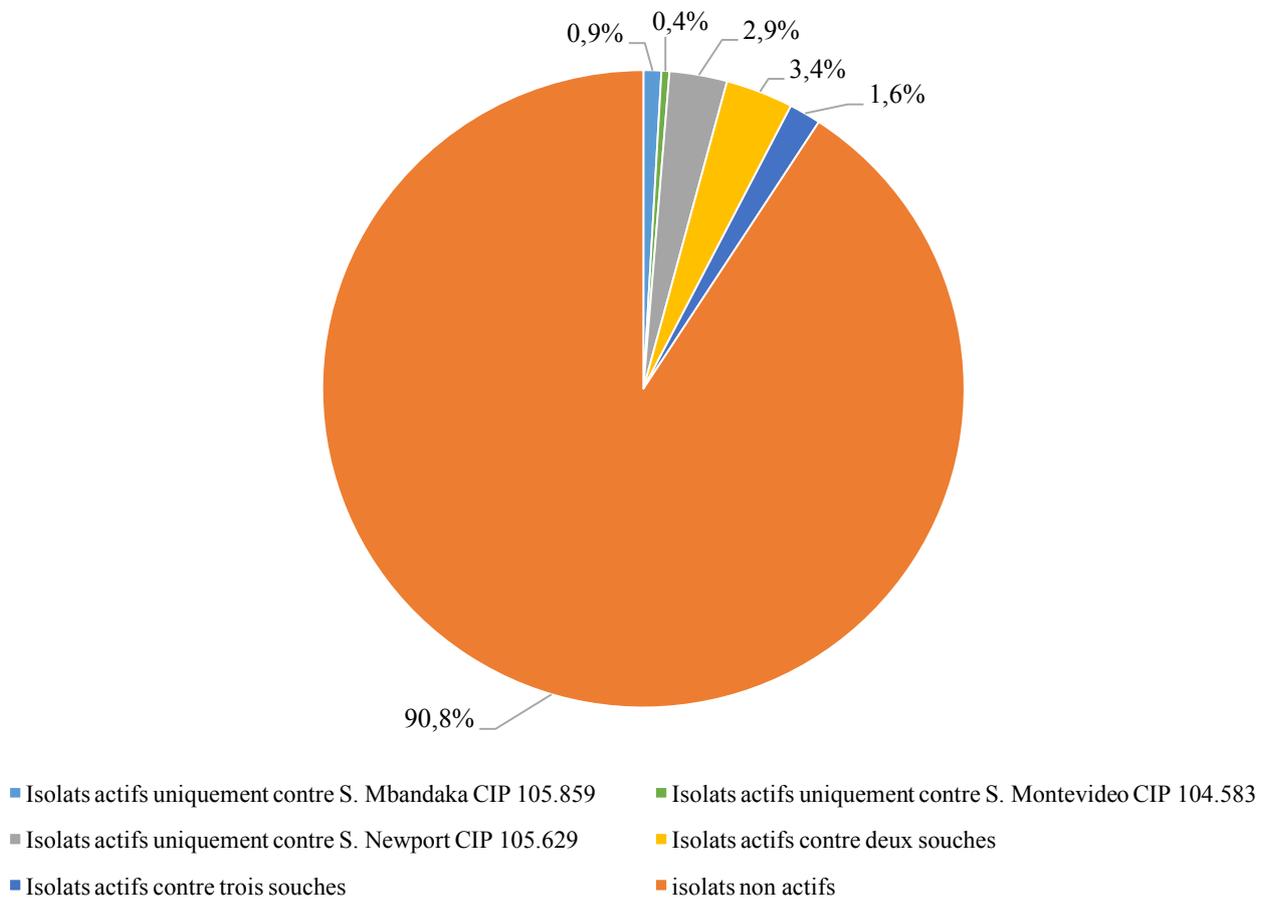


Figure 23 : Répartition en pourcentage des isolats actifs contre les différents sérovars de *Salmonella* en milieu gélosé BHI

Le tableau 39 répertorie le nombre et pourcentage d'isolats antagonistes contre les différentes *Salmonella* en fonction de leurs genres. C'est le genre le genre *Lactococcus* qui est le premier avec 24 isolats actifs contre *S. Newport*, suivi du genre *Aerococcus* avec 21 isolats actifs contre cette souche. Si l'on compare pour le sérovar Mbandaka c'est le genre *Aerococcus* le plus actif avec 22 isolats contre 16 pour *Lactococcus*. La même tendance est retrouvée pour le sérovar Montevideo avec 16 isolats du genre *Aerococcus* actifs et 10 pour *Lactococcus*. Concernant les genres non actifs, aucune *Actinobacteria* n'est active sur aucune des trois souches testées.

Tableau 39 : Isolats actifs contre trois souches de *Salmonella* en milieu BHI

Genre présumé	Nombre (pourcentage) d'isolats actifs en milieu BHI			
	Nombre d'isolats criblés	<i>S. Mbandaka</i> CIP 105.859	<i>S. Montevideo</i> CIP 104.583	<i>S. Newport</i> CIP 105.629
<i>Aerococcus</i>	31	22 (70,9)	16 (51,6)	21 (67,7)
<i>Alcaligenes</i>	3	1 (33,3)	2 (66,6)	1 (33,3)
<i>Candida</i>	9	6 (66)	3 (33,3)	6 (66,6)
<i>Enterococcus</i>	30	1 (3,3)	0	1 (3,3)
<i>Geotrichum</i>	4	2 (50)	2 (50)	4 (100)
<i>Hafnia</i>	8	1 (12,5)	1 (12,5)	4 (50)
<i>Kluyveromyces</i>	9	0	2 (22,2)	0
<i>Lactobacillus</i>	322	4 (1,2)	3 (0,93)	4 (1,2)
<i>Lactococcus</i>	536	16 (2,9)	10 (1,8)	24 (4,5)
<i>Leuconostoc</i>	102	1 (0,9)	0	3 (2,9)
<i>Pediococcus</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Pichia</i>	3	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	34	3 (8,8)	2 (5,8)	10 (29,4)
<i>Raoultella</i>	4	2 (50)	0	1 (25)
<i>Staphylococcus</i>	96	0	4 (4,1)	11 (11,4)
<i>Streptococcus</i>	10	1 (10)	0	0
<i>Weissella</i>	8	0	1 (12,5)	0
<i>Yarrowia</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
Pas d'identification	66	5 (7,5)	7 (10,6)	14 (21,2)
Autres isolats ^a	169	0	0	0
Nombre total d'isolats	1 450	67 (4,7)	55 (3,8)	105 (7,2)

^a*Acinetobacter* (7), *Arthrobacter* (17), *Brachybacterium* (3), *Brevibacillus* (1), *Brevibacterium* (12), *Carnobacterium* (6), *Corynebacterium* (23), *Cryptococcus* (1), *Curtobacterium* (1), *Cutaneotrichosporon* (1), *Debaryomyces* (2), *Dietzia* (1), *Escherichia* (1), *Ewingella* (1), *Exiguobacterium* (1), *Gordonia* (1), *Halomonas* (1), *Jeotgalicoccus* (9), *Kocuria* (10), *Leifsonia* (2), *Leucobacter* (8), *Macroccoccus* (11), *Microbacterium* (13), *Microcaccaceae* (4), *Micrococcus* (3), *Obesumbacterium* (2), *Ochrobactrum* (3), *Pantoea* (1), *Pseudoclavibacter* (2), *Psychrobacter* (8), *Renibacterium* (1), *Rhodococcus* (4), *Rothia* (2), *Stenotrophomonas* (5), et *Trichosporon* (1)

Les résultats obtenus pour le milieu lait sont indiqués sur la figure 24. Dans ces conditions, 267 isolats ont montré une activité inhibitrice contre au moins une souche de *Salmonella*. Ici également *Salmonella* Newport CIP 105.629 est la souche la plus sensible avec 73 (5%) isolats actifs contre uniquement cette souche. Viennent ensuite *S. Montevideo* CIP 104.583 avec 51 isolats (3,5%) et *S. Mbandaka* CIP 105.859 avec 41 isolats actifs (2,8%). Un pourcentage plus important d'isolats

inhibiteurs est observé par rapport au milieu BHI, avec deux fois plus d'isolats actifs : 134 (9,2%) en milieu BHI et 267 en milieu lait (18,4%).

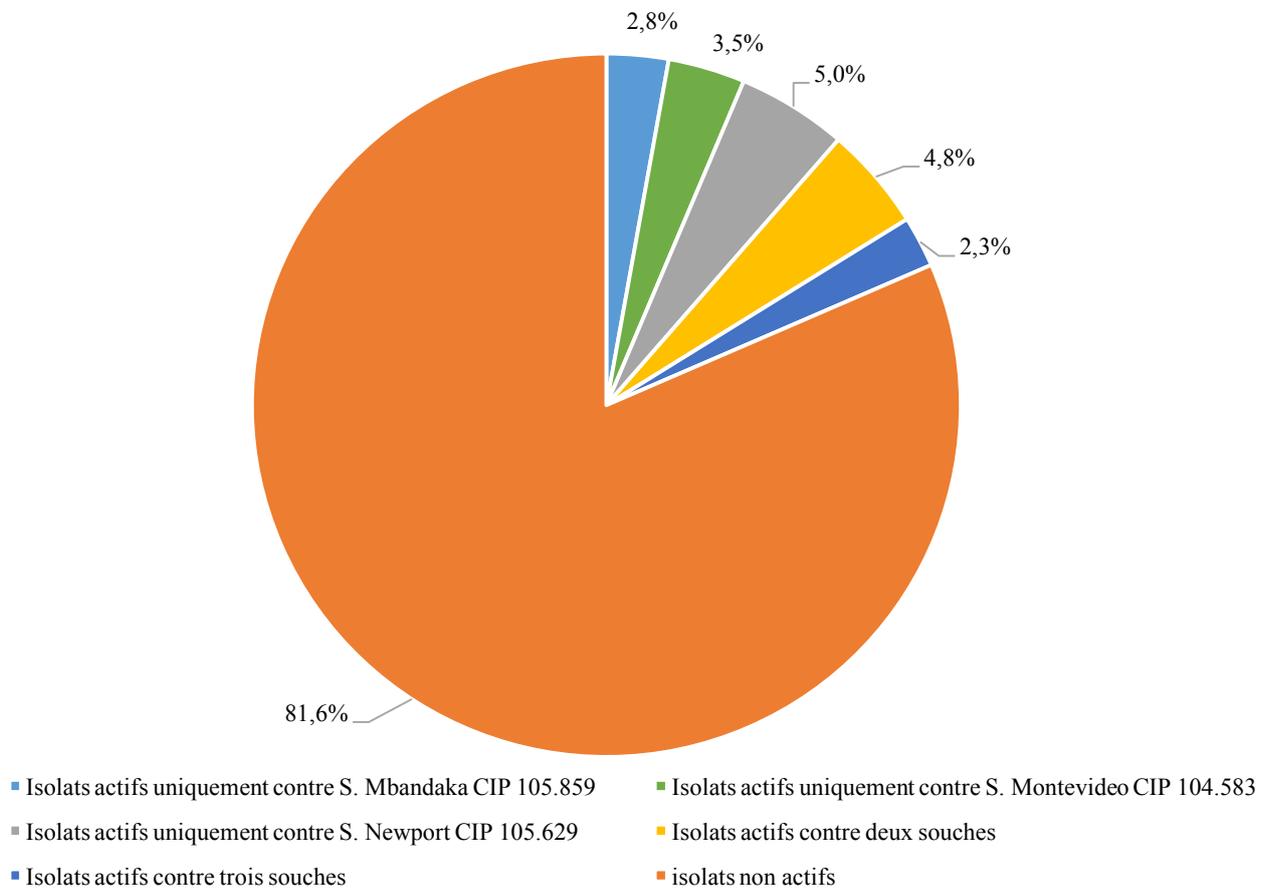


Figure 24 : Répartition en pourcentage des isolats actifs contre les différents sérovars de *Salmonella* en milieu gélosé « lait »

Globalement, pour chaque sérovar et en fonction du nombre d'isolats testés pour un même genre, c'est encore une fois le genre *Aerococcus* qui présente la plus forte proportion de souches inhibitrices avec jusqu'à 19 isolats soit 61,2% du nombre d'isolats testés (Tableau 40). En termes de nombre d'isolats actifs, c'est le genre *Lactococcus* qui compte le nombre le plus important avec 86 isolats actifs contre la souche du sérovar Newport, suivi encore une fois d'*Aerococcus* avec 19 isolats actifs contre *S. Montevideo* CIP 104.583.

En comparant ces résultats à ceux obtenus en milieu BHI, d'autres genres bactériens actifs faisant partie de la famille des bactéries lactiques sont retrouvés. En effet sur milieu BHI les genres actifs majoritaires étaient *Aerococcus*, *Lactococcus*, pour les bactéries lactiques, suivis de *Staphylococcus* et *Pseudomonas*. Sur milieu lait les genres *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, appartenant tous à la famille des bactéries lactiques, sont majoritairement retrouvés.

Il semblerait ici que le milieu lait soit plus approprié pour la mise en évidence d'inhibition pour ces genres bactériens. Une souche du genre *Brachybacterium* était active contre *S. Newport* CIP 105.629 alors qu'en milieu BHI aucune *Actinobacteria* n'était active. Le genre *Lactococcus*, comme en milieu BHI, génère le plus grand nombre d'isolats actifs contre *S. Newport* CIP 105.629 avec 86 isolats, suivi de *Aerococcus* avec 18 isolats.

Tableau 40 : Isolats actifs contre trois souches de *Salmonella* en milieu « lait »

Genre présumé	Nombre d'isolats criblés	Nombre (pourcentage) d'isolats actifs en milieu « lait »		
		<i>S. Mbandaka</i> CIP 105.859	<i>S. Montevideo</i> CIP 104.583	<i>S. Newport</i> CIP 105.629
<i>Aerococcus</i>	31	17 (54,8)	19 (61,2)	18 (58,1)
<i>Alcaligenes</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Brachybacterium</i>	3	0	0	1 (33,3)
<i>Candida</i>	9	1 (11,1)	1 (11,1)	1 (11,1)
<i>Enterococcus</i>	30	4 (13,3)	7 (23,3)	4 (13,3)
<i>Hafnia</i>	8	0	0	2 (25)
<i>Lactobacillus</i>	322	14 (4,3)	11 (3,4)	11 (3,4)
<i>Lactococcus</i>	536	57 (10,6)	70 (13,1)	86 (16)
<i>Leuconostoc</i>	102	14 (13,7)	8 (7,8)	4 (3,9)
<i>Pediococcus</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Pichia</i>	3	0	1 (33,3)	0
<i>Pseudomonas</i>	34	4 (11,7)	2 (5,8)	7 (20,5)
<i>Raoultella</i>	4	1 (25)	1 (25)	1 (25)
<i>Staphylococcus</i>	96	0	2 (2,1)	2 (2,1)
<i>Streptococcus</i>	10	1 (10)	3 (30)	0
<i>Yarrowia</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
Pas d'identification	66	3 (4,5)	7 (10,6)	12 (18,2)
Autres isolats ^a	169	0	0	0
Nombre total d'isolats	1 450	119 (8,2)	135 (9,3)	151 (10,4)

^a*Acinetobacter* (7), *Arthrobacter* (17), *Brevibacillus* (1), *Brevibacterium* (12), *Carnobacterium* (6), *Corynebacterium* (23), *Cryptococcus* (1), *Curtobacterium* (1), *Cutaneotrichosporon* (1), *Debaryomyces* (2), *Dietzia* (1), *Escherichia* (1), *Ewingella* (1), *Exiguobacterium* (1), *Geotrichum* (4), *Gordonia* (1), *Halomonas* (1), *Jeotgalicoccus* (9), *Kluyveromyces* (9), *Kocuria* (10), *Leifsonia* (2), *Leucobacter* (8), *Macroccoccus* (11), *Microbacterium* (13), *Microcaccaceae* (4), *Micrococcus* (3), *Obesumbacterium* (2), *Ochrobactrum* (3), *Pantoea* (1), *Pseudoclavibacter* (2), *Psychrobacter* (8), *Renibacterium* (1), *Rhodococcus* (4), *Rothia* (2), *Stenotrophomonas* (5), *Trichosporon* (1) et *Weilsella* (8)

En milieu fromage, 257 isolats avaient une activité antagoniste contre au moins un sérovar (Figure 25). La répartition des pourcentages d'isolats actifs contre les différents sérovats est assez similaire à celle obtenue en milieu « lait ». Ici les deux souches les plus sensibles sont *S. Montevideo* CIP 104.583 et *S. Newport* CIP 105.629 avec respectivement 57 et 56 isolats actifs. Pour le sérovar *S. Mbandaka* CIP 105.859 on obtient 44 isolats actifs. Un pourcentage plus important d'isolats inhibiteurs est constaté par rapport au milieu BHI avec presque deux fois plus d'isolats actifs : 134 (9,2%) en milieu BHI et 257 en milieu lait (17,7%).

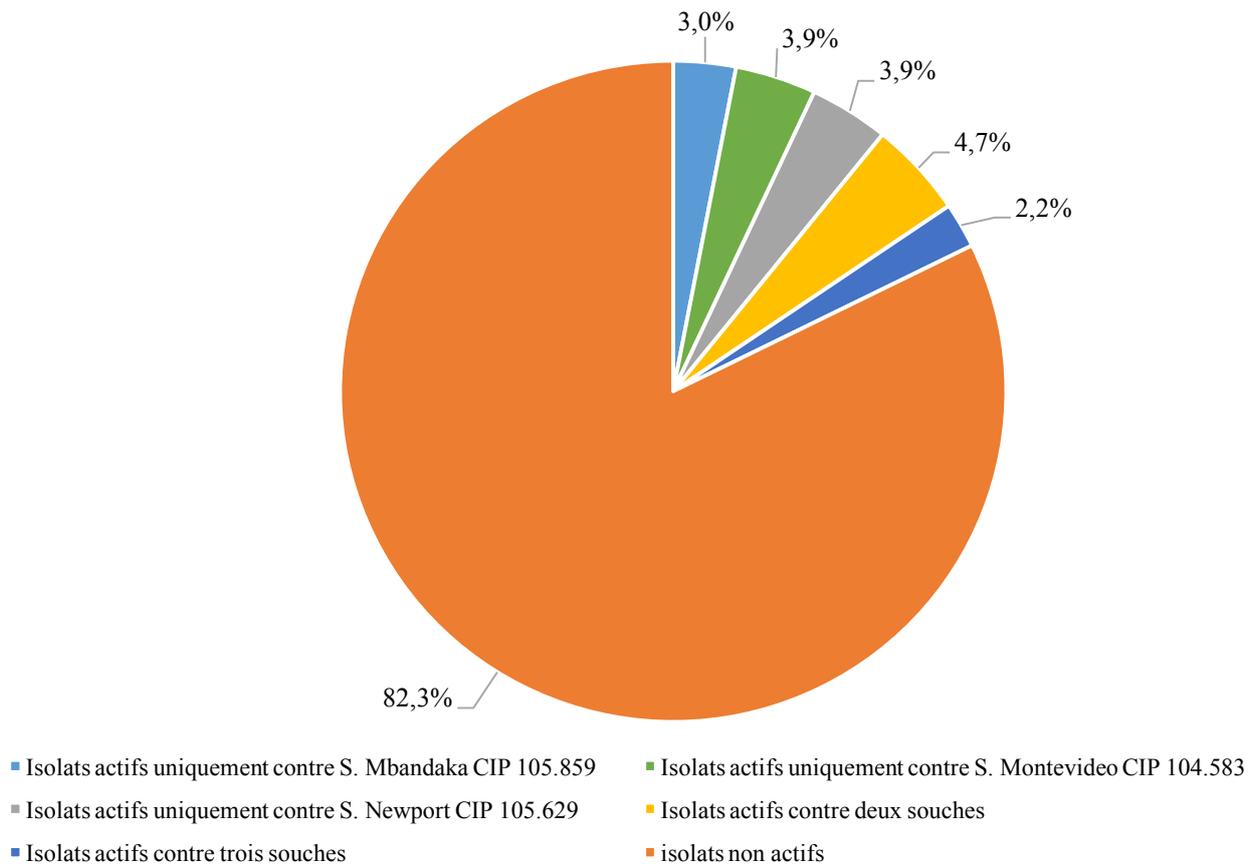


Figure 25 : Répartition en pourcentage des isolats actifs contre les différents sérovats de *Salmonella* en milieu « fromage »

Le tableau 41 met en évidence le pourcentage d'isolats actifs en fonction de leur genre en milieu agar fromage. Comme précédemment le genre *Lactococcus* possède le nombre d'isolats actifs le plus important contre les trois souches, suivi des genres *Leuconostoc* et *Aerococcus*. Sur milieu fromage un nombre important d'isolats du genre *Leuconostoc* inhibiteurs est observé avec jusqu'à 27 actifs contre la souche *S. Newport* CIP 105.629. Egalement, un isolat du genre *Brachybacterium* était actif sur cette même souche. Malgré un nombre important d'isolats criblés, un faible nombre d'isolats

actifs au sein du genre *Lactobacillus* est mis en évidence avec 11 isolats actifs contre *S. Newport* CIP 105.629, 8 contre *S. Montevideo* CP 104.583 et 8 contre *S. Mbandaka* CIP 104.583.

Tableau 41 : Isolats actifs contre trois souches de *Salmonella* en milieu « fromage »

Genre présumé	Nombre d'isolats criblés	Nombre (pourcentage) d'isolats actifs en milieu « fromage »		
		<i>S. Mbandaka</i> CIP 105.859	<i>S. Montevideo</i> CIP 104.583	<i>S. Newport</i> CIP 105.629
<i>Aerococcus</i>	31	20 (64,5)	18 (58,1)	19 (61,3)
<i>Brachybacterium</i>	3	0	0	1 (33,3)
<i>Enterococcus</i>	30	3 (10)	8 (26,6)	1 (3,3)
<i>Geotrichum</i>	4	2 (50)	0	0
<i>Kluyveromyces</i>	9	1 (11,1)	0	0
<i>Lactobacillus</i>	322	9 (2,7)	8 (2,4)	11 (3,4)
<i>Lactococcus</i>	536	59 (11)	66 (12,3)	65 (12,1)
<i>Leuconostoc</i>	102	16 (15,6)	20 (19,6)	27 (26,4)
<i>Pantoea</i>	1	0	0	1 (100)
<i>Pediococcus</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Pseudomonas</i>	34	1 (2,9)	1 (2,9)	2 (5,9)
<i>Raoultella</i>	4	0	0	1 (25)
<i>Staphylococcus</i>	96	1 (1,1)	3 (3,3)	2 (2,2)
<i>Streptococcus</i>	10	1 (10)	1 (10)	0
<i>Weissella</i>	8	1 (12,5)	2 (25)	0
Pas d'identification	66	3 (4,5)	4 (6,1)	8 (12,1)
Autres isolats ^a	169	0	0	0
Nombre total d'isolats	1 450	118 (8,1)	132 (9,1)	139 (9,6)

^a*Acinetobacter* (7), *Alcaligenes* (3), *Arthrobacter* (17), *Brevibacillus* (1), *Brevibacterium* (12), *Candida* (9), *Carnobacterium* (6), *Corynebacterium* (23), *Cryptococcus* (1), *Curtobacterium* (1), *Cutaneotrichosporon* (1), *Debaryomyces* (2), *Dietzia* (1), *Escherichia* (1), *Ewingella* (1), *Exiguobacterium* (1), *Hafnia* (8), *Geotrichum* (4), *Gordonia* (1), *Halomonas* (1), *Jeotgalicoccus* (9), *Kluyveromyces* (9), *Kocuria* (10), *Leifsonia* (2), *Leucobacter* (8), *Macroccoccus* (11), *Microbacterium* (13), *Microcaccaceae* (4), *Micrococcus* (3), *Obesumbacterium* (2), *Ochrobactrum* (3), *Pantoea* (1), *Pichia* (3), *Pseudoclavibacter* (2), *Psychrobacter* (8), *Renibacterium* (1), *Rhodococcus* (4), *Rothia* (2), *Stenotrophomonas* (5), *Trichosporon* (1), *Yarrowia* (3) et *Weissella* (8)

Dans un premier temps une activité plus importante est observée sur les milieux « lait » et « fromage » avec presque le double d'isolats actifs en comparaison avec le BHI agar. La majorité des isolats actifs faisant partie de la famille des bactéries lactiques, ce résultat pourrait s'expliquer par des conditions de culture plus favorables à cette famille. Cette observation est en accord avec une étude mettant en évidence une activité plus importante des bactéries lactiques en milieu agar lait par rapport au milieu MRS (Matevosyan et al., 2019a). La composition beaucoup plus complexe de la matrice lait et fromage peut influencer la production de composés antimicrobiens. Une seconde étude a

montré une augmentation de l'activité des bactéries lactiques en présence d'ions calcium et magnésium (Matevosyan et al., 2019b). Ces minéraux sont présents dans les deux matrices lait et fromage. Pour *Salmonella* les conditions de culture ont également été choisies par rapport au projet. L'objectif de ce criblage était de mettre *Salmonella* dans des conditions de croissance les plus optimales afin de sélectionner les isolats les plus actifs. Le choix de température s'est porté sur 30°C afin de rester dans des conditions retrouvées dans le processus de transformation du fromage mais également favorables à la croissance de *Salmonella*.

Parmi les isolats actifs sur ce criblage ressort majoritairement le genre *Lactococcus*. Cela s'explique notamment par le fait que le nombre d'isolats testés pour ce genre était plus important que pour les autres genres. D'autre part, la littérature met en évidence le fort potentiel antagoniste de ce genre (El Kheir et al., 2018) et plus largement du groupe des bactéries lactiques (Carr et al., 2002). De manière intéressante le genre *Aerococcus*, appartenant également au groupe des bactéries lactiques mais peu étudié pour ses propriétés en tant qu'agent bioprotecteur, ressort également dans ce criblage.

1.3. Sélection d'isolats inhibiteurs par amensalisme et/ou antibiose

Dans le cadre du projet CESam, nous nous intéressons aux isolats actifs sur les différents milieux gélosés dont particulièrement « lait » et « fromage ». En effet l'objectif de cette étude est de sélectionner des isolats pouvant être actifs en matrice laitière et/ou fromagère et ainsi de combiner des isolats permettant de couvrir tout le processus de transformation. Afin de se rapprocher des sérovars problématiques en Normandie au moment de cette étude, la sélection s'est principalement axée sur les souches *S. Mbandaka* CIP 104.583 et *S. Montevideo* CP 104.583. A partir des 447 isolats actifs, une sélection de 49 isolats a été effectuée en fonction de l'activité sur les milieux « lait » et « fromage » ainsi que contre les différents sérovar de *Salmonella* (Tableau 27). L'objectif ici était de sélectionner des isolats actifs sur un seul milieu, sur les deux milieux mais également contre une ou plusieurs des souches testées. L'ensemble des isolats sélectionnés ont été identifiés par séquençage. Le tableau 42 répertorie les 49 candidats ainsi que leurs activités sur les différents milieux et contre les différents sérovars. Parmi ces isolats, il y a 23 représentants du genre *Lactococcus* dont 21 de l'espèce *L. lactis* et deux *L. raffinolactis*, neuf *Aerococcus urinaeequi*, quatre représentants du genre *Leuconostoc* dont trois *Ln mesenteroides* et un *Ln citreum*, deux *R. planticola* et un représentant pour les espèces suivantes : *Alcaligenes faecalis*, *Candida anglica*, *Enterococcus faecalis*, *Hafnia alvei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas lundensis*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus parauberis* et *Str. gallolyticus*, *Weissella hellenica* et *Yarrowia lipolytica*. Ici l'isolat, pouvant être responsable de mammites, *Streptococcus parauberis* a été conservé afin de travailler sans « a priori ».

Tableau 42 : Sélection des 49 isolats en fonction de leurs activités sur les différents milieux et souches de *Salmonella*

Numéro UCMA	Espèce	<i>Salmonella</i> Mbandaka		<i>Salmonella</i> Montevideo		<i>Salmonella</i> Newport	
		CIP 105.859		CIP 104.583		CIP 105.629	
		Lait	Fromage	Lait	Fromage	Lait	Fromage
5972	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	+	+	+	+	+	+
7402	<i>Pseudomonas lundensis</i>	+	+	+	+	+	+
8483	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
8501	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
18046	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	+	+	+	+	+	+
6472	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	-	+	+	+
7340	<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	-	+	+	+
13205	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	-	+	+
18022	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	+	+
3066	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	-	+
4460	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	+	-	+
4459	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	+	+	-	+
9863	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	-	+	-	+
4514	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	+	-	+	-	+
6078	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	-	+	-	+	-	+
21105	<i>Streptococcus parauberis</i>	-	+	-	+	-	+
21106	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	+	-	+
6761	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	-	-	-	+	-	+
1495	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	-	-	+
4441	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	-	-	+
5042	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	-	-	+
21107	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	-	+
6731	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	-	+	-	-	-	+
12627	<i>Raoultella planticola</i>	-	-	-	-	-	+
21108	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	+	-	+	-	-	-
1594	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	-
18010	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	+	+	+	+	+	-
18036	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	+	+	+	+	+	-
18039	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	+	+	+	+	+	-
1044	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	-	+	+	-
9110	<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	-	+	+	-
5744	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	+	+	+	-	+	-
1053	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	+	-
3915	<i>Raoultella planticola</i>	+	-	+	-	+	-
4132	<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	-	+	-	+	-
4571	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	-	-	+	-
12716	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	-	+	-
6360	<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	+	+	-	-
4546	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	+	-	-
1049	<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	-	+	-	-
1068	<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	-	+	-	-
4512	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	-	+	-	+	-	-
4515	<i>Weissella hellenica</i>	-	+	-	+	-	-
4935	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	-	-	-
1151	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-	-	-
1676	<i>Leuconostoc citreum</i>	+	-	+	-	-	-
11210	<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	-	+	-	-	-
11417	<i>Candida anglica</i>	+	-	+	-	-	-
21104	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	+	-	+	-	-	-

1.4. Criblage sur les souches de *Salmonella* de terrain

Les 49 isolats sélectionnés ont été testés contre un panel de 26 souches de *Salmonella* de terrain afin d'évaluer l'activité des candidats sur des souches isolées en Normandie dans l'environnement laitier. Un isolat a été considéré actif s'il était capable d'inhiber au moins 80% des souches de *Salmonella* testées.

Les résultats obtenus sur milieu « lait » sont présentés en figure 26 ci-dessous. Dans ce milieu, 20 isolats ont été capables d'inhiber plus de 80% des souches testées avec un isolat du genre *Lactococcus* inhibant toutes les souches. Parmi les isolats actifs il y a 12 isolats de l'espèce *Lactococcus lactis*, cinq *Aerococcus urinaequi*, un *Leuconostoc citreum*, une *Raoultella planticola* et un *Alcaligenes faecalis*.

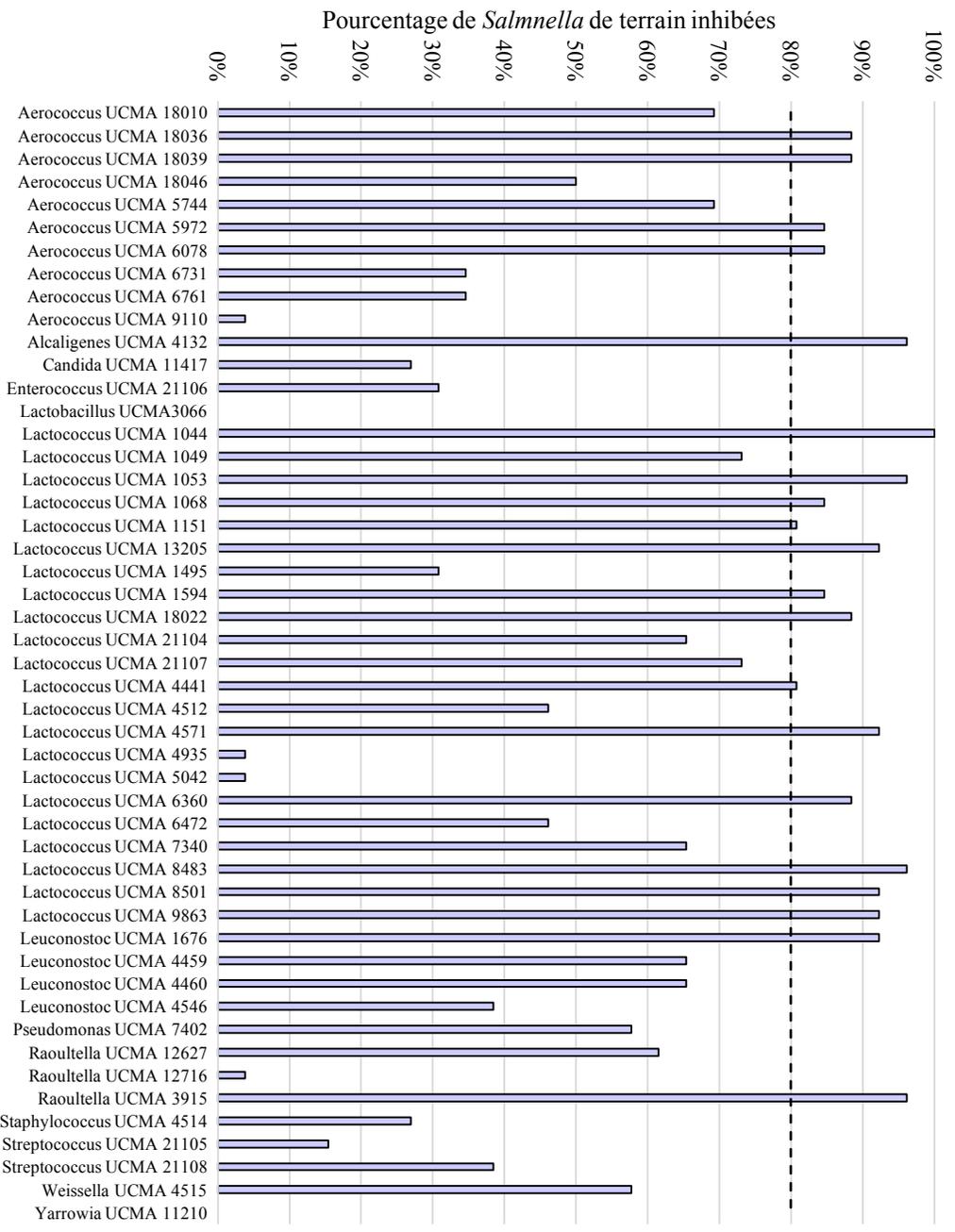


Figure 26 : Représentation de l'activité des isolats contre les 26 souches de *Salmonella* testées en milieu « lait »

En milieu « fromage » on obtient plus d'isolats actifs avec 23 ayant une activité antagoniste contre au moins 80% des souches. Ici deux isolats ont été capables d'inhiber toutes les souches, cependant le panel de souches testées par sérovar n'est pas assez important pour valider une inhibition de toutes les souches d'un même sérovar par ces isolats (Figure 27).

Parmi les isolats actifs il y a 14 *Lactococcus lactis*, cinq *Aerococcus urinaeequi*, deux *Lactococcus raffinolactis*, un *Pseudomonas lundensis* et un *Streptococcus parauberis*. Comme pour le criblage sur le milieu lait la majorité des isolats actifs appartiennent à la famille des bactéries lactiques avec les genres *Lactococcus* et *Aerococcus* très présents.

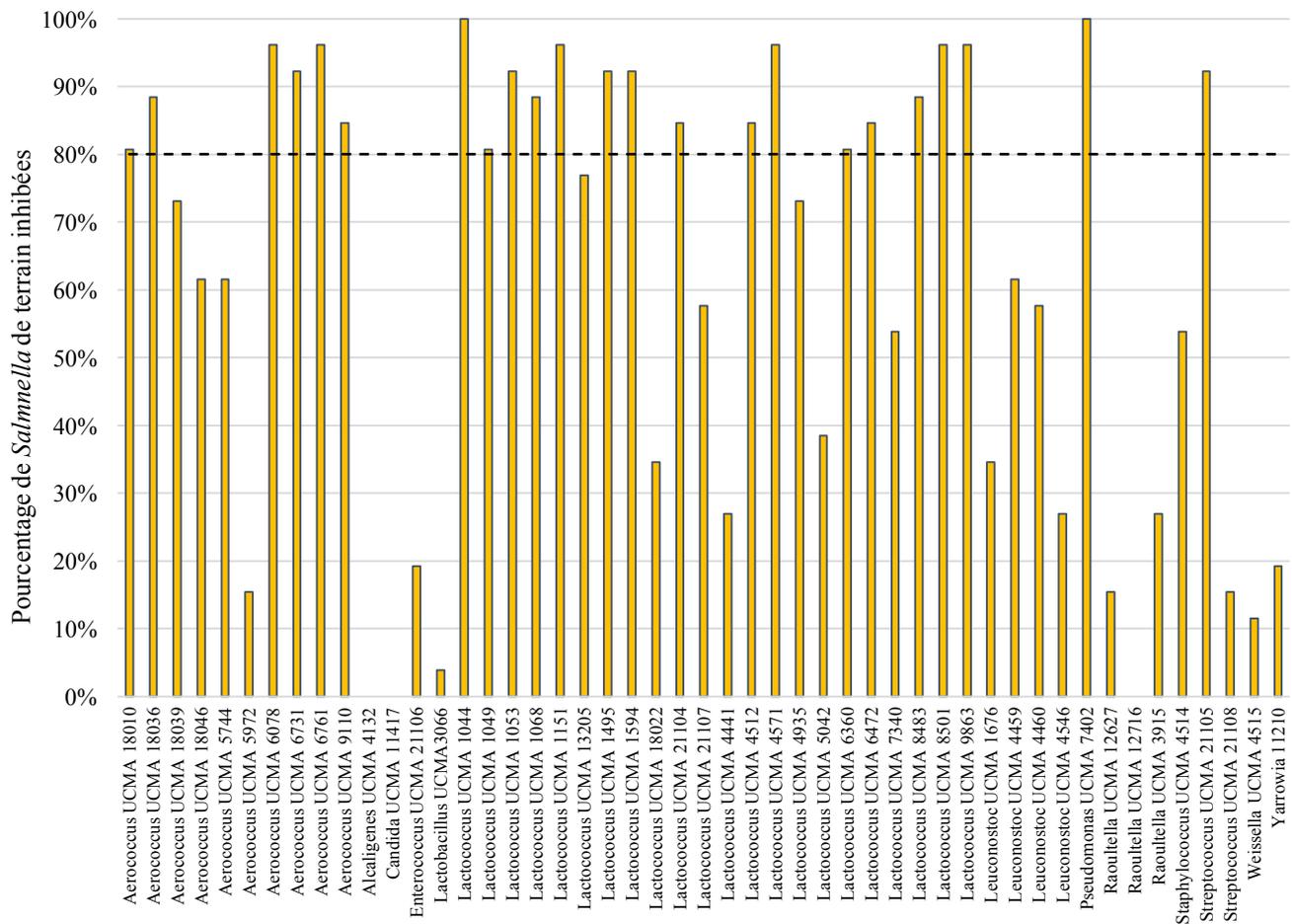


Figure 27 : Représentation de l'activité des isolats contre les 29 souches de *Salmonella* testées en milieu « fromage »

Le tableau 43 représente la sélection de 31 isolats (sur les 49 testés) effectuée suivant le pourcentage de souches de *Salmonella* inhibées sur le milieu lait et le milieu fromage. La majorité des isolats appartiennent aux genres *Lactococcus* et *Aerococcus*. Parmi les agents sélectionnés, on retrouve 10 isolats du genre *Lactococcus*, et deux du genre *Aerococcus* actifs sur au moins 80% des souches de *Salmonella* sur les deux milieux « lait » et « fromage ».

Tableau 43 : Bilan des souches sélectionnées sur le criblage par amensalisme et/ou antibiose

Numéro UCMA	Espèce	Pourcentage de <i>Salmonella</i> de terrain inhibées		Isolat sélectionné
		Lait	Fromage	
5972	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	85	15	Oui
18039	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	88	73	Oui
6731	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	35	92	Oui
6761	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	35	96	Oui
18010	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	69	81	Oui
6078	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	85	96	Oui
18036	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	88	88	Oui
4132	<i>Alcaligenes faecalis</i>	96	0	Oui
4441	<i>Lactococcus lactis</i>	81	27	Oui
13205	<i>Lactococcus lactis</i>	92	77	Oui
18022	<i>Lactococcus lactis</i>	88	35	Oui
1049	<i>Lactococcus lactis</i>	73	81	Oui
1495	<i>Lactococcus lactis</i>	31	92	Oui
6472	<i>Lactococcus lactis</i>	46	85	Oui
9110	<i>Lactococcus lactis</i>	4	85	Oui
1151	<i>Lactococcus lactis</i>	81	96	Oui
1044	<i>Lactococcus lactis</i>	100	100	Oui
1053	<i>Lactococcus lactis</i>	96	92	Oui
1068	<i>Lactococcus lactis</i>	85	88	Oui
1594	<i>Lactococcus lactis</i>	85	92	Oui
4571	<i>Lactococcus lactis</i>	92	96	Oui
6360	<i>Lactococcus lactis</i>	88	81	Oui
8483	<i>Lactococcus lactis</i>	96	88	Oui
8501	<i>Lactococcus lactis</i>	92	96	Oui
9863	<i>Lactococcus lactis</i>	92	96	Oui
4512	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	46	85	Oui
21104	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	65	85	Oui
1676	<i>Leuconostoc citreum</i>	92	35	Oui
7402	<i>Pseudomonas lundensis</i>	58	100	Oui
3915	<i>Raoultella planticola</i>	96	27	Oui
21105	<i>Streptococcus parauberis</i>	15	92	Oui
5744	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	69	62	Non
18046	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	50	62	Non
11417	<i>Candida anglica</i>	27	0	Non
21106	<i>Enterococcus faecalis</i>	31	19	Non
12716	<i>Hafnia alvei</i>	4	0	Non
3066	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	4	Non
4935	<i>Lactococcus lactis</i>	4	73	Non
5042	<i>Lactococcus lactis</i>	4	38	Non
7340	<i>Lactococcus lactis</i>	65	54	Non
21107	<i>Lactococcus lactis</i>	73	58	Non
4459	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	65	62	Non
4460	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	65	58	Non
4546	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	38	27	Non
12627	<i>Raoultella planticola</i>	62	15	Non
4514	<i>Staphylococcus xylosus</i>	27	54	Non
21108	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	38	15	Non
4515	<i>Weissella hellenica</i>	58	12	Non
11210	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	19	Non

2. Criblage par action de type interaction nutritionnelle

2.1. Recherche des nutriments potentiellement enjeux de compétition

Dans un premier temps, l'étude des composés utilisés par *Salmonella* a été menée par deux approches afin d'identifier les potentiels enjeux de compétition. La première approche a été l'utilisation de plaques BIOLOG GEN IIITM permettant de mettre en évidence l'utilisation de multiples sources carbonées dont un certain nombre sont susceptibles d'être rencontrées en matrice laitière. La seconde approche a été de quantifier des oligo-éléments présents dans le lait avant et après croissance de *Salmonella* afin d'identifier ceux présents en concentration faible mais potentiellement nécessaires à la croissance du pathogène.

2.1.1. Mise en évidence des capacités nutritionnelles de *Salmonella* par le système BIOLOG GEN III MicroPlateTM

Les analyses par l'utilisation du système BIOLOG ont été réalisées sur 18 isolats de *Salmonella* appartenant aux sérovars Mbandaka (neuf isolats), Montevideo (quatre isolats), Panama (deux isolats), Ohio (deux isolats) et Anatum (un isolat) provenant de différentes matrices (§ 3.2.1.1 p 95).

Le tableau 44 représente parmi différentes sources de carbone celles majoritairement consommées par les différentes souches ainsi que la résistance à différents éléments chimiques et autres composés. Un gradient de couleur a été utilisé ici pour mettre en évidence le nombre de souches utilisant la source carbonée ou pouvant se développer en présence des éléments chimiques.

D'une manière générale la majorité des isolats ont le même profil. Parmi les 71 sources de carbone, 47 sont utilisées par la majorité des isolats de *Salmonella*. Si l'on compare les souches, les profils ne sont pas caractéristiques des sérovars ou encore de leur provenance. Cependant trois isolats présentent quelques caractéristiques « uniques » d'utilisation de sources de carbones en comparaison avec le profil général des souches testées.

La souche *S. Mbandaka* UCMA 19837 est celle qui présente le plus de variations avec le profil général puisqu'elle est capable d'utiliser le gentibiose, stachyose, D galactosamine, l'acide D-galacturonique ainsi que l'acide D-galacturonique lactone.

La souche *S. Panama* UCMA 17917 est capable de métaboliser le D-arabitol ainsi que l'ester méthylique de l'acide D-lactique. Enfin, l'isolat *S. Ohio* UCMA 19886 utilise les acides gamma-amino-butyrique, D,L-Beta-hydroxy-butyrique et formique.

Si l'on regarde les éléments présents dans la matrice laitière on confirme que le lactose, sucre présent dans le lait, n'est pas utilisé par les souches testées de *Salmonella*. Cependant, les sous-produits de l'hydrolyse du lactose, le glucose et le galactose, sont eux consommés par les 16

isolats. Des acides aminés dominants dans le lait et consommés sont retrouvés, comme l'acide L-glutamique ou encore l'acide L-aspartique, pouvant être des sources de carbone possibles, ou bien encore des nucléosides avec l'inosine.

Les isolats sont également capables de consommer les acides N-acetyl neuraminique et citrique, tous les deux présents dans le lait. C'est aussi le cas pour les acides L-lactique, propionique, acétique et formique qui peuvent être présents en faible concentration dans le lait, comme l'acide lactique, mais très présents dans le fromage suite à des fermentations microbiennes. L'inositol, également présent dans le lait, est utilisé par la moitié des isolats testés.

Tableau 44 : Profil des isolats de *Salmonella* testés à l'aide des plaques BIOLOG GEN III

Sources de carbone	%*	Sources de carbone	%*	Autres éléments	%
Témoin négatif	0	Gélatine	0	Contrôle positif	100
Dextrine	100	Glycyl-L-proline	94	pH 6	100
D-maltose	100	L-alanine	100	pH 5	100
D-tréhalose	100	L-arginine	50	NaCl 1%	100
D-cellobiose	6	Acide L-aspartique	100	NaCl 4%	100
Gentiobiose	6	Acide L-glutamique	100	NaCl 8%	25
Saccharose	0	L-histidine	81	Lactate de sodium 1%	100
D-turanose	0	Acide L-pyroglutamique	0	Acide fusique	100
Stachyose	6	L-sérine	100	D-sérine	100
D-raffinose	0	Pectine	94	troleandomycine	100
D-lactose	0	Acide D-galacturonique	6	Ritamycine	100
D-melibiose	95	Acide D-galacturonique lactone	6	Monicycline	18
B-méthyl-D-glucoside	83	Acide D-gluconique	100	Lyncomycine	100
D-salicine	0	Acide D-glucoronique	100	Guanidine HCl	100
N-acétyl-D-glucosamine	100	Glucuronamide	56	Niaproof 4	100
N-acétyl-D-mannosamine	100	Acide mucique	94	Vancomycine	100
N-acétyl-D-galactosamine	6	Acide quinique	0	Tétrazolium violet	69
Acide N-acétyl neuramique	100	Acide D-saccharique	94	Tétrazolium bleu	100
D-glucose	100	Acide hydroxyphenyl acétique	88	Acide nalidixique	56
D-mannose	100	Pyruvate de méthyle	100	Chlorure de lithium	100
D-fructose	100	Ester méthylique acide D-lactique	6	Potassium tellurite	0
D-galactose	100	Acide L-lactique	100	Aztreonam	94
3-methyl-glucose	0	Acide citrique	100	Sodium butyrate	100
D-fucose	0	Acide alpha-ceto-glutarique	0	Sodium bromate	88
L-fucose	94	Acide D-malique	0		
L-rhamnose	100	Acide L-malique	100		
Inosine	100	Acide bromo-succinique	100		
D-sorbitol	94	Tween 40	88		
D-mannitol	100	Acide gamma-amino-butyrique	6		
D-arabitol	6	Acide alpha-hydroxy-butyrique	88		
Myo-inositol	54	Acide D,L-Beta-hydroxy-butyrique	6		
Glycerol	100	Acide alpha ceto-butyrique	63		
D-glucose-6-PO4	100	Acide acéto-acétique	88		
D-fructose-6-PO4	100	Acide propionique	88		
D-acide aspartique	100	Acide acétique	100		
D-sérine	100	Acide formique	6		

* : pourcentage de souches capables d'utiliser les composés

Le profil établi à l'aide de la plaque GEN III confirme l'état des lieux effectué dans la bibliographie sur la capacité de *Salmonella* à utiliser de nombreuses sources de carbone et à résister à différents éléments chimiques. Des sources carbonées telles que le glucose, le mannose, le fructose et le galactose, consommés par toutes les souches testées sont retrouvées. Les résultats obtenus ici sont en corrélation avec deux autres études réalisées sur les sources de carbone et d'azote du genre *Salmonella* (Gutnick et al., 1969; Chai et al., 2012). Dans la première étude plus de 600 sources avaient été testées et une centaine étaient utilisées par *Salmonella*. Dans la seconde étude 190 sources de carbones ont été testées. Seulement 27% des sources de carbone étaient utilisées parmi les huit souches de *S. Typhi* testées. Si l'on compare avec d'autres entérobactéries telle que *E. coli* c'est assez faible. Dans notre étude le nombre de sources de carbone testées était beaucoup plus faible. Il aurait pu être intéressant de tester tous les acides aminés présents dans la matrice laitière. Cependant on a pu constater quelques différences entre les différents sérovars même si, d'une manière générale, le profil des souches était similaire.

Si l'on regarde les éléments consommés par un grand nombre des souches testées (plus de 80%) et présents en concentrations faibles dans le lait on retrouve principalement certains acides aminés tels que la L-alanine ou la L-sérine. L'utilisation de ces composés par les souches de *Salmonella* testées permet d'émettre l'hypothèse que ces éléments peuvent être considérés comme des facteurs de compétition lors de co-culture avec d'autres micro-organismes. Cependant l'utilisation de cette plaque ne permet pas de mettre en évidence les capacités nutritives pour les sources d'azotes très nombreuses du lait.

De manière intéressante certains éléments présents dans le lait comme l'acide lactique qui aurait pu être considéré comme inhibiteur de la croissance n'a pas empêché les isolats de se développer. En effet, avec une concentration de 1% en acide lactique, toutes les souches ont montré une croissance et ce dans un milieu minimum. De plus, l'acide lactique est une source de carbone dont la concentration dans le lait, mais pas dans le caillé, pourrait être considérée comme « limitante ».

Les éléments présents dans cette plaque et dans la matrice laitière montrent que le genre *Salmonella* est tout à fait capable de croître dans cette matrice laitière et permet d'identifier de potentiels facteurs de compétition.

2.1.2. Mise en évidence des minéraux présents dans le lait par analyse ICP-MS

Une analyse plus poussée des éléments présents dans le lait a ensuite été effectuée à l'aide d'une analyse par spectrométrie à torche au plasma couplé à un spectromètre de masse (ICP-MS). Cette analyse avait deux objectifs : déterminer la stabilité de la composition en minéraux entre

différents laits (cru et reconstitué), déterminer les potentiels facteurs de compétition et mettre en évidence ceux captés par *Salmonella*.

Le tableau 45 ci-dessous présente les concentrations en éléments chimiques de deux laits crus provenant de deux fermes différentes ainsi que d'un lait en poudre écrémé reconstitué. Le résultat est exprimé en mg/L de lait pour chacun des éléments.

Les résultats pour l'aluminium, le silicium et le titane ne sont pas représentés dans le tableau car le calcul de justesse de l'analyse était trop faible (inférieur à 60%) pour que la quantification soit acceptable. Il est également important de noter que le calcul de justesse pour le sodium, le plomb, le magnésium et le fer a été considéré « moyennement acceptable » (inférieur à 90%).

Les concentrations en éléments pour les trois laits (crus et reconstitué) sont similaires pour la majorité des éléments et correspondent aux concentrations décrites dans la littérature. Cependant le lait cru de la ferme 2 se différencie par sa concentration en potassium plus importante que les deux autres laits (jusqu'à + 488 mg/L). La concentration en Bore était deux fois plus importante dans le lait en poudre par rapport aux laits crus. Une concentration en fer légèrement plus importante dans le lait cru 2 et en zinc dans le lait cru 2 et dans le lait écrémé reconstitué peut également être observée.

Tableau 45 : Quantification de différents éléments chimiques dans trois laits par analyse en ICP-MS

(n = 1)

Elément (mg/L)	Lait cru 1 (écart-type)	Lait cru 2 (écart-type)	Lait écrémé reconstitué (écart-type)
Antimoine	nd	nd	nd
Arsenic	nd	nd	nd
Baryum	0,06 (0,004)	0,08 (0,006)	0,06 (0,002)
Bore	0,13 (0,004)	0,15 (0,004)	0,35 (0,005)
Cadmium	nd	nd	nd
Calcium	1 283 (9,6)	1 143 (10,6)	1 301 (3,6)
Chrome	0,003 (0,001)	0,003 (0,001)	0,003 (0,001)
Cobalt	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)
Cuivre	0,04 (0,001)	0,05 (0,001)	0,04 (0,001)
Fer	0,19 (0,01)	0,32 (0,1)	0,20 (0,01)
Magnésium	103,96 (1,7)	90,32 (3,8)	117,70 (3,3)
Manganèse	0,02 (0,001)	0,02 (0,001)	0,02 (0,001)
Molybdène	0,03 (0,001)	0,05 (0,001)	0,05 (0,001)
Nickel	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)	0,002 (0,001)
Phosphore	1 055 (26,9)	1 014 (43,1)	1 091 (25,8)
Plomb	nd	nd	nd
Potassium	890,96 (230,1)	1 202,65 (201,4)	714,03 (60,4)
Sélénium	0,02 (0,001)	0,01 (0,001)	0,03 (0,001)
Sodium	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,16 (0,01)
Soufre	376 (9,6)	347 (10,6)	391 (3,6)
Vanadium	0,005 (0,001)	0,005 (0,001)	0,005 (0,001)
Zinc	3,85 (0,04)	4,15 (0,19)	4,45 (0,1)

Ces analyses mettent en évidence la composition riche du lait en éléments chimiques et corroborent la littérature (Jenness, 1974; Park and Haenlein, 2013; Guetouache et al., 2014; Jeantet and Croguennec, 2018). En effet la majorité des composés pouvant être des co-facteurs enzymatiques pour les bactéries sont présents en concentrations faibles (le fer, le zinc, le cuivre et le manganèse). Les mêmes concentrations pour la plupart des éléments testés sont constatées aussi bien dans deux laits crus issus de fermes différentes mais également d'un lait écrémé reconstitué. Les quelques variations de concentrations pour certains composés peuvent s'expliquer par la variabilité des conditions d'élevage des vaches (alimentation, environnement, nature du sol) se traduisant sur la composition du lait. Cependant les facteurs potentiellement limitants restent les mêmes et permettent aux micro-organismes de se développer en intervenant en tant que facteurs de croissance.

L'objectif second était de déterminer les éléments captés par *Salmonella* dans le lait afin de comparer avec les concentrations présentes dans la matrice nonensemencée. La composition des différents laits étant globalement similaire, les cultures de *Salmonella* ont été effectuées en lait en poudre reconstitué. Les résultats des concentrations sont représentés dans le tableau 46. Les pourcentages du sodium, de l'aluminium, du baryum, et du silicium n'ont pas été représentés en raison d'un pourcentage de justesse trop bas. Les résultats obtenus ici peuvent être différents des précédents de par une minéralisation de l'échantillon différente.

L'analyse a été faite dans le lait après élimination des cellules par centrifugation. Si l'on regarde les éléments présents à des concentrations faibles dans le lait on constate que *Salmonella* consomme une très grande partie du chrome avec jusqu'à 99% de la quantité initiale de consommée. Le fer, connu pour son importance dans la croissance bactérienne, diminue de 91%. La valeur d'autres éléments chimiques présents en concentration limitante diminue également après croissance de *Salmonella* dans le milieu avec : le cuivre (jusqu'à - 32%), le magnésium (jusqu'à - 41%), le manganèse (jusqu'à - 60%), le molybdène (jusqu'à - 60%), et le zinc (jusqu'à - 61%). Cependant ces résultats sont à prendre avec du recul car ils ne constituent que des données exploratoires obtenues sur une seule détermination.

Tableau 46 : Pourcentage par analyse ICP-MS des différents éléments chimiques captés dans le surnageant de culture de *Salmonella* UCMA 19909 et UCMA 12999 après culture en lait écrémé reconstitué

Elément	<i>S. Mbandaka</i> UCMA 19909	<i>S. Typhimurium</i> UCMA 12999
Pourcentage capté par rapport au lait nonensemencé		
Antimoine	nd	nd
Arsenic	nd	nd
Béryllium	nd	nd
Bore	21	36
Cadmium	nd	nd
Calcium	30	42
Chrome	99	98
Cobalt	nd	nd
Cuivre	31	32
Fer	91	90
Magnésium	28	41
Manganèse	54	60
Molybdène	50	60
Nickel	nd	nd
Phosphore	30	44
Plomb	nd	nd
Potassium	13	27
Sélénium	26	48
Soufre	31	44
Vanadium	0	0
Zinc	51	61

nd : non détecté

L'analyse de la composition après croissance de *Salmonella* dans le lait a permis de visualiser et de quantifier les éléments qui seraient les plus consommés et leur pourcentage par rapport au lait de départ nonensemencé. *Salmonella* semble capable de capter certains éléments présents dans la matrice dont notamment certains facteurs essentiels à la croissance d'autres bactéries tels que le fer et le manganèse. Comme évoqué dans l'introduction, la capacité de certaines souches de *Salmonella* à produire deux sidérophore, l'aérobactine et l'enterobactine, a été mise en évidence. Cela confirme que ces éléments pourraient représenter des facteurs de compétition entre le microbiote du lait cru, les ferments, et *Salmonella*.

2.2. Validation de la méthodologie de criblage

Une approche en milieu liquide chimiquement défini a été développée, basée sur le signal luminescent émis par des souches de *Salmonella* transformées en corrélation directe avec l'activité métabolique bactérienne. Afin de valider l'utilisation des souches UCMA 20268^{lux+} (*S.*

Typhimurium) et UCMA 20269^{lux+} (*S. Mbandaka*) pour la suite de cette étude, plusieurs prérequis importants ont été évalués.

2.2.1. Impact de la transformation sur la croissance des souches

La croissance des souches transformées et non transformées a été mesurée à l'aide d'un suivi de la DO_{600nm} pendant 24 heures en milieu LB. La figure 28 représente les différentes courbes de croissance (triplicata interne). Aucune différence de croissance n'a été observée entre les souches transformées et sauvages, cependant on a pu observer une DO plus importante pour les souches de *S. Typhimurium*. Après 24 heures de croissance les souches ont atteint une DO_{600nm} comprise entre 1,1 et 1,3. Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée lors de la construction du plasmide validant sa stabilité et son utilisation en tant que rapporteur de l'activité métabolique bactérienne (Howe et al., 2010).

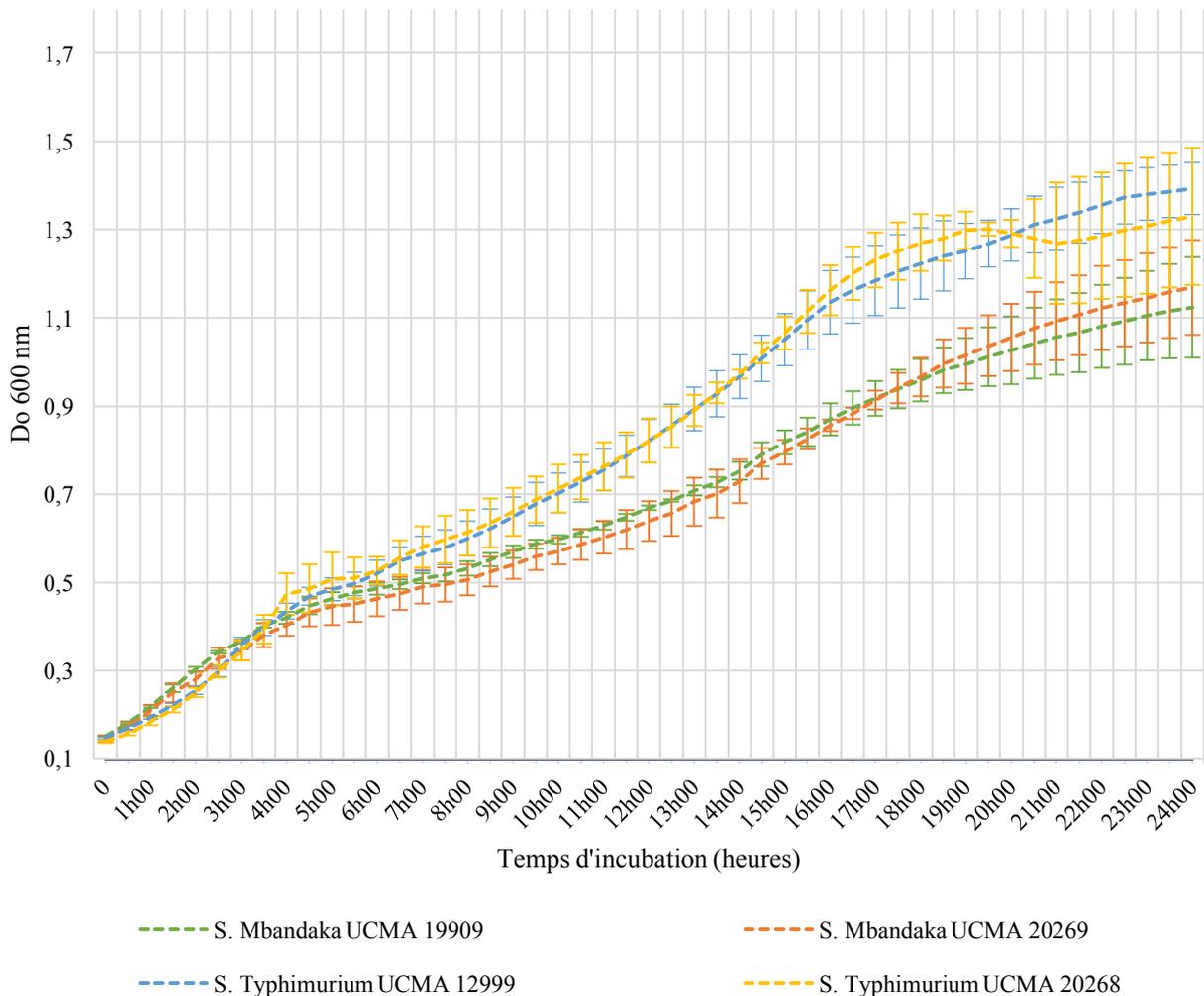


Figure 28 : Courbe de croissance des deux souches transformées UCMA 20268^{lux+} et UCMA 20269^{lux+} et non transformées UCMA 19909 et UCMA 12999 en milieu LB à 37°C

2.2.2. Vérification de la stabilité du transposon et validation de l'effet temps réel du signal

La figure 29 représente la courbe de luminescence des deux souches transformées avec et sans ajout d'ampicilline en milieu LB.

Sans ajout d'ampicilline, la présence d'un signal luminescent tout au long de la croissance est observé, caractérisant une bonne intégration du transposon. Si les courbes des deux souches ont le même aspect, un signal de luminescence plus important est observé pour la souche *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+} en comparaison avec la souche *S. Typhimurium* UCMA 20268^{lux+} pouvant caractériser une activité métabolique plus importante. Pour les deux souches on a pu observer l'apparition de pic pour chaque cinétique effectuée. A l'heure actuelle aucun élément dans la construction du plasmide ne permet d'expliquer ce phénomène. Il serait intéressant de rechercher une explication via le métabolisme et/ou l'état physiologique bactérien.

Afin de vérifier la lecture en temps réel, une solution d'ampicilline a été ajoutée après quatre heures de croissance en milieu de phase exponentielle. Après une heure seulement le signal luminescent pour les deux souches avaient atteint le niveau basal (identique à l'eau stérile et au milieu LB), caractérisant la perte totale d'activité métabolique. La mesure en temps réel de l'activité métabolique a donc été confirmée avec une baisse du signal rapide après l'ajout d'ampicilline.

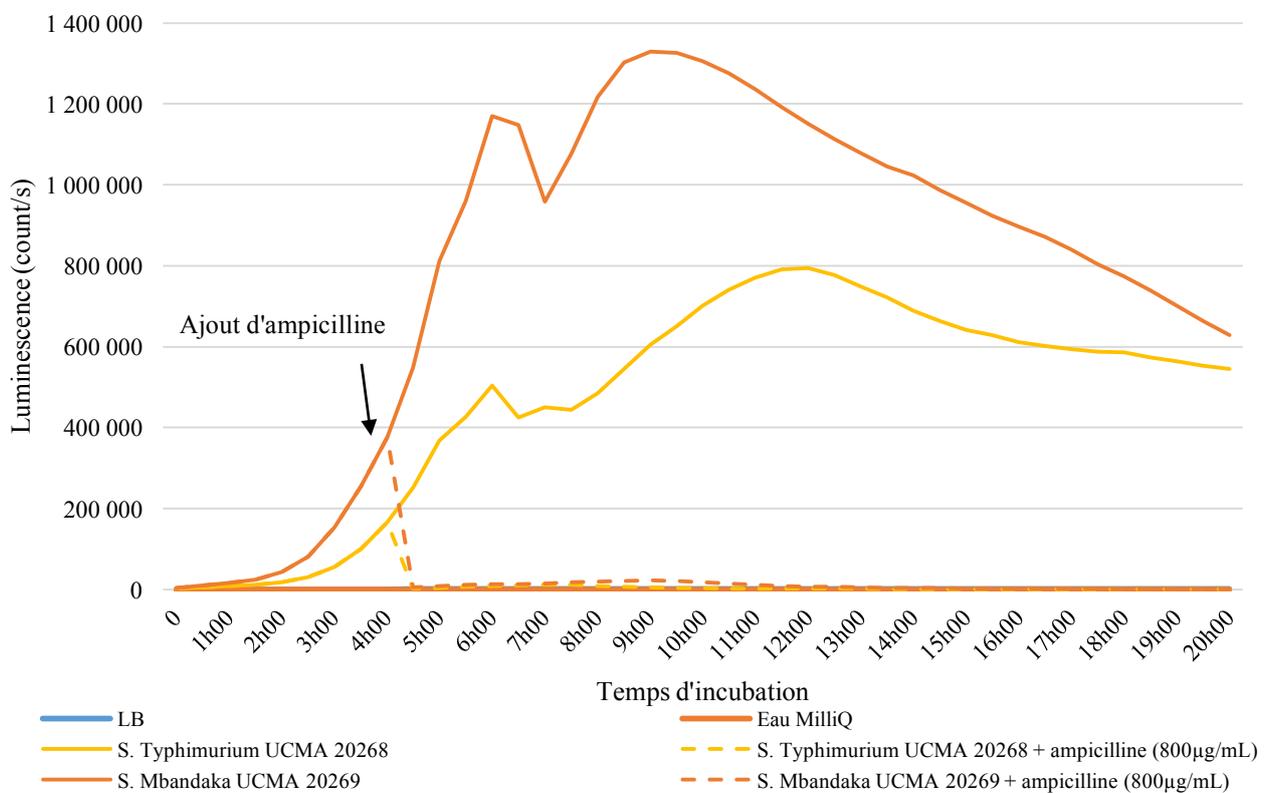


Figure 29 : Evaluation de la transposition et mesure en temps réel de la luminescence sur les deux souches transformées en milieu LB

La stabilité du transposon a été évaluée à l'aide de sub-cultures en LB liquide réalisées tous les jours pendant 16 jours à partir d'une culture mère. Après 12 heures à 30°C une mesure de la luminescence a été effectuée pour chaque sub-culture (une mesure tous les trois jours). On observe une stabilité de la mesure de la luminescence des souches transformées pendant les 16 jours avec une légère baisse du signal au 10^{ème} jour pour la souche *Salmonella* Typhimurium UCMA 20268^{lux+} (Figure 30). Cette stabilité du signal a également été observée pour la mesure de la luminescence basale des souches non transformées, au même niveau que celle de l'eau miliQ ainsi que du milieu stérile. L'activité métabolique évaluée par le signal luminescent était stable dans le temps.

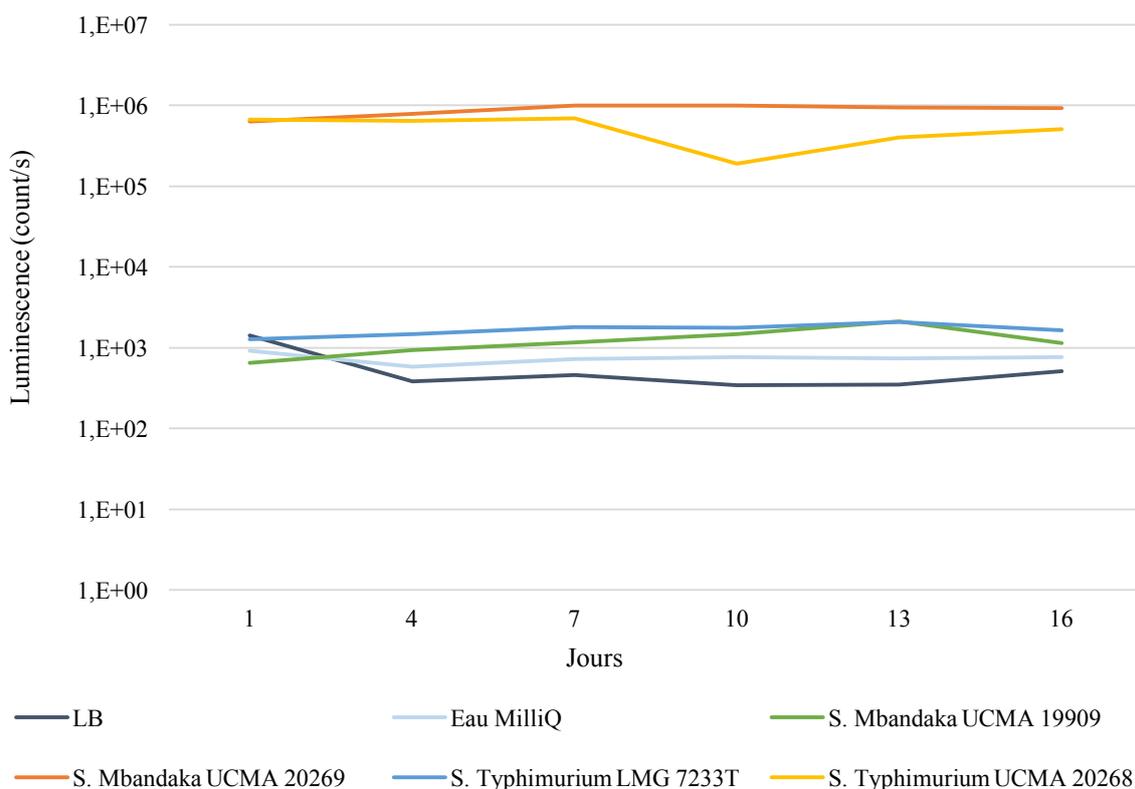


Figure 30 : Evaluation de la stabilité du transposon chez les deux souches de *Salmonella* transformées au cours du temps en milieu LB

2.2.3. Validation des conditions d'analyse

Afin de valider l'utilisation des milieux chimiquement définis, la comparaison de la croissance dans les deux milieux a été évaluée par rapport au milieu LB dans les conditions de températures adéquates. La figure 31 ci-dessous représente les mesures de DO_{600nm} au cours du temps. La croissance a été réalisée pendant 24 heures à 30°C pour le milieu chimiquement défini lait ainsi que le milieu LB et 48 heures à 15°C pour le milieu chimiquement défini fromage. Il y a une bonne

croissance des souches allant jusqu'à une DO de 1 dans le milieu synthétique lait malgré une différence avec le milieu LB. On peut observer un temps de latence inférieur ou égal à 4 heures en comparaison avec le milieu chimiquement défini fromage où il est supérieur ou égal à 7 heures. La croissance en milieu milieu chimiquement défini fromage est encore plus basse de par la température d'incubation fixée à 15°C avec une DO à 48 heures comprise entre 0,5 et 0,6. Les deux milieux chimiquement définis ne sont pas considérés comme des milieux optimaux pour la croissance de *Salmonella*. La croissance des deux souches dans les deux milieux chimiquement définis, malgré le caractère limitant de la composition de ces milieux, permet de valider leur utilisation pour le criblage.

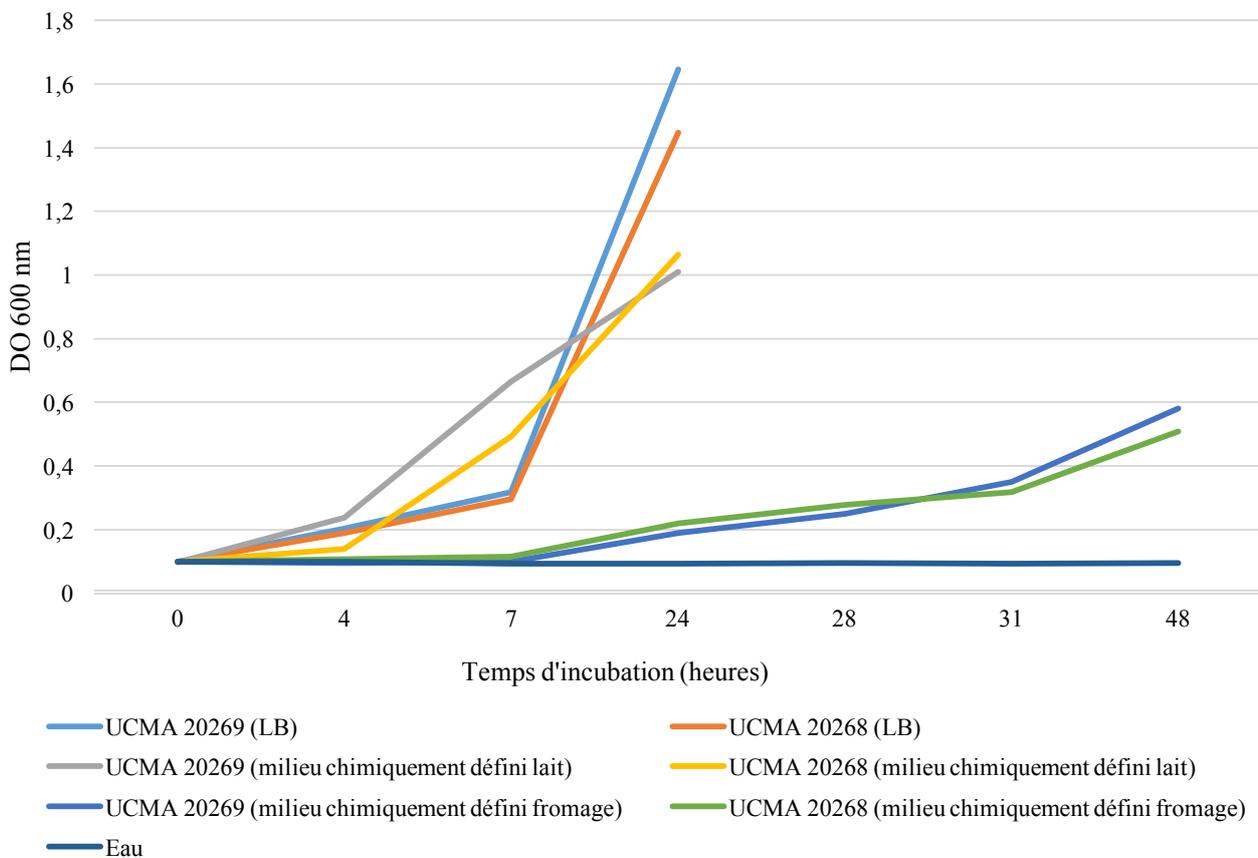


Figure 31 : Comparaison de la croissance des souches transformées en milieux chimiquement définis VS un milieu riche LB

L'utilisation de la bioluminescence comme rapporteur de la croissance bactérienne est de plus en plus pratiquée, notamment dans le domaine de l'industrie alimentaire et les avantages de cette méthode sont bien connus (Morrissey et al., 2013). Il existe de nombreuses variantes avec l'utilisation de quelques gènes de l'opéron *Lux* ou de l'ensemble des gènes. Il est également possible de moduler l'expression en utilisant des promoteurs modifiés (Riedel et al., 2007). Dans cette dernière étude il a

également été mis en évidence des résultats plus reproductibles en comparant le suivi de croissance via la luminescence par rapport à des méthodes classiques d'isolement sur gélose.

Après validation de la transformation des souches et des conditions de culture cette méthodologie miniaturisée semble adaptée pour le suivi de l'activité métabolique de *Salmonella* lors d'une co-culture bactérienne.

2.2.4. *Corrélation entre croissance et luminescence*

L'évolution de la luminescence a été comparée à celle de la DO afin d'évaluer les liens pouvant être établis entre les deux types de mesure. La figure 32 représente le comparatif entre DO et luminescence pour les souches transformées et non transformées. En DO une croissance légèrement plus lente est de nouveau observée pour la souche transformée UCMA 20268^{lux+} avec un temps de latence plus prononcé. Pour les souches transformées un parallèle peut être établi entre le signal luminescent et le suivi de la DO en début et en fin de phase exponentielle, et avec une légère baisse de la luminescence en phase stationnaire. Cependant en luminescence, pour les deux souches, le pic qui est observé après 4-5 heures d'incubation qui ne peut pas être relié à la courbe de DO. Une légère remontée du pic est constatée aux alentours de 6 heures d'incubation correspondant à une reprise de l'activité métabolique. La luminescence traduisant l'activité métabolique et non la croissance bactérienne directement il semble cohérent d'obtenir des profils de courbes différents. La baisse de luminescence observée correspond à la phase stationnaire et se traduit par une baisse de l'activité métabolique. Cette observation semble en accord avec la potentielle phase de « dormance » des bactéries entrant dans cette phase stationnaire. Egalement, un signal luminescent basal est observé pour les souches non transformées correspondant à la luminescence détectée pour le témoin négatif, l'eau.

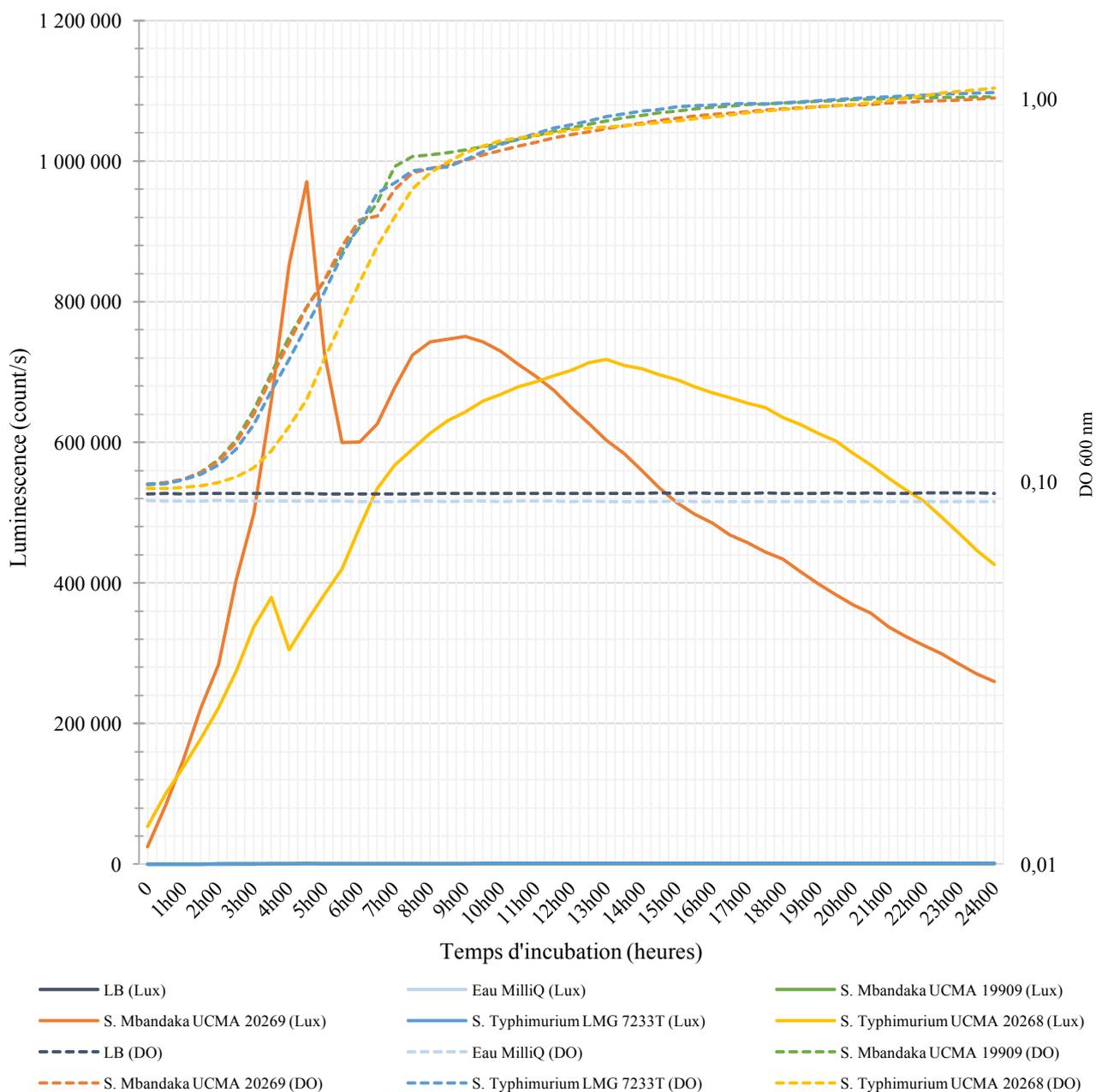


Figure 32 : Corrélation entre luminescence et densité optique des souches transformées et non transformées en milieu LB à 37 °C

2.2.5. Comparaison entre vitesse de croissance et luminescence

La corrélation entre la vitesse de croissance et la la luminescence a été évaluée pour chaque souche à partir des résultats précédents obtenus en milieu LB . La figure 33 représente l'évolution de la vitesse de croissance en DO et de la luminescence pour la souche *S. Typhimurium* UCMA 20268^{lux+}. Un décalage d'environ cinq heures est observé entre la chute de la vitesse de croissance et la baisse la luminescence.

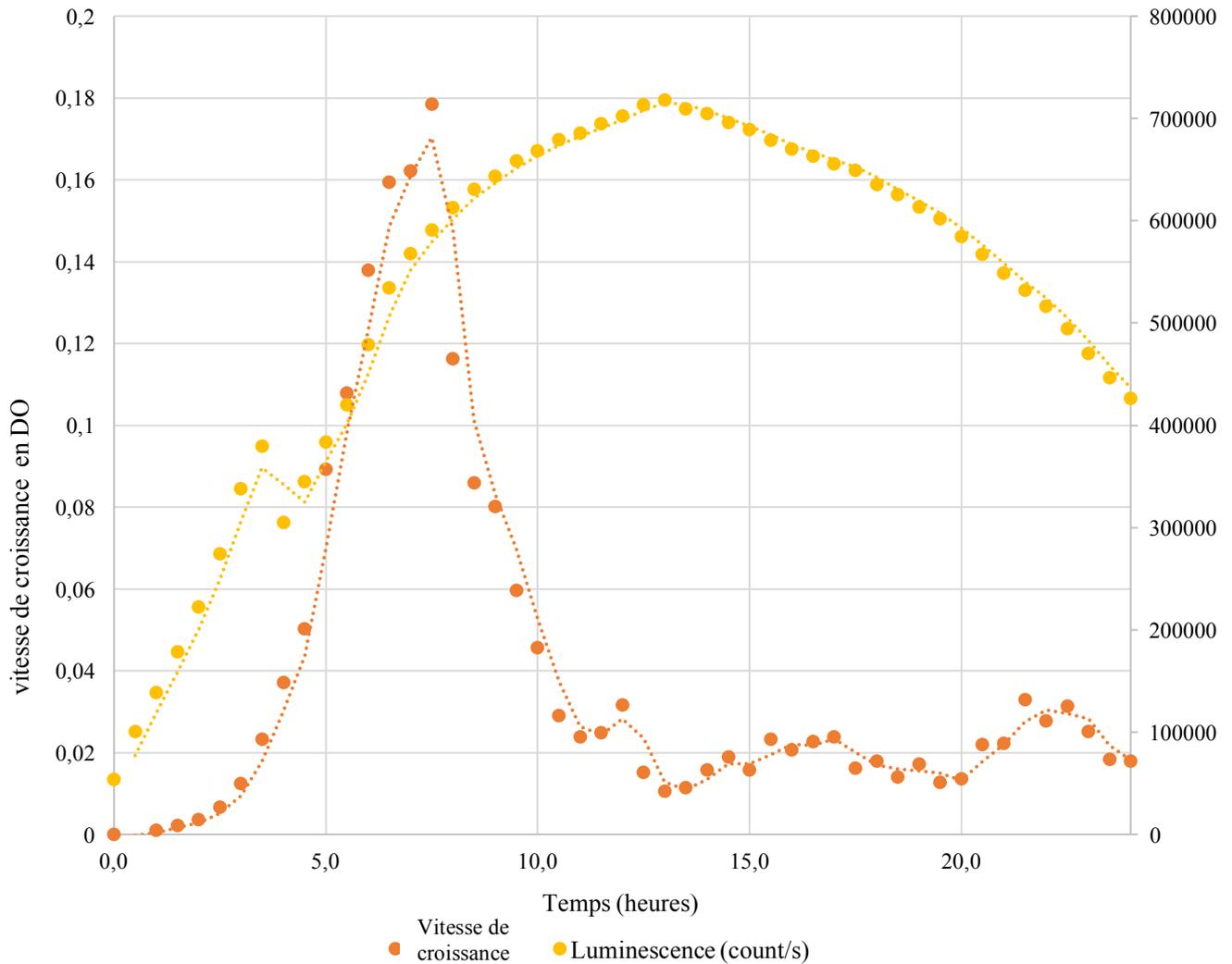


Figure 33 : Représentation du suivi de DO et de luminescence pour la souche *S. Typhimurium* UCMA 20268^{lux+} en milieu chimiquement défini lait

De ce fait, si l'on regarde la corrélation entre ces deux paramètres pour cette souche il n'existe pas de corrélation ($r = 0,13$) entre la vitesse de croissance en DO et la luminescence, sur l'ensemble des 24 heures (Figure 34).

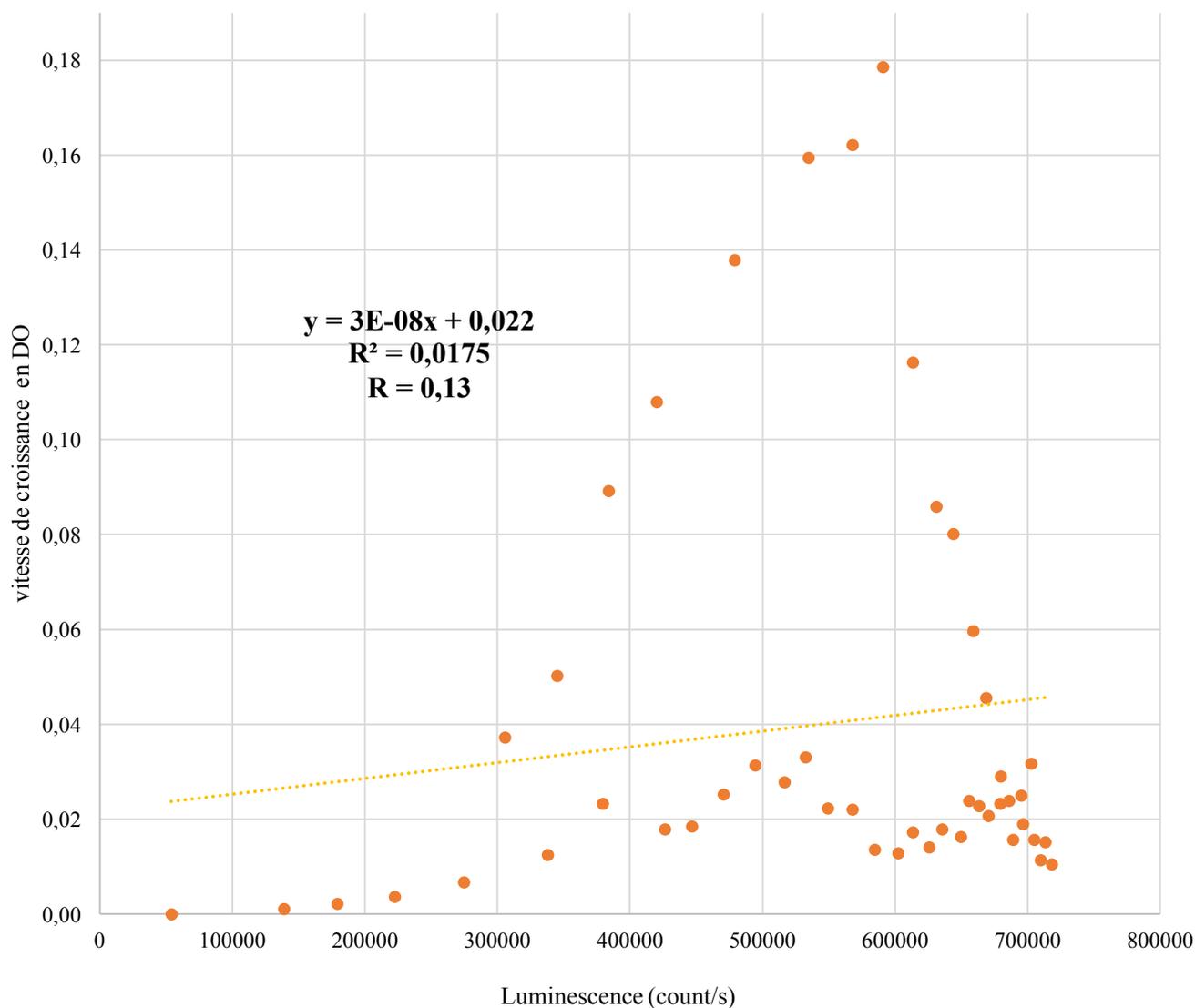


Figure 34 : Corrélation entre vitesse de croissance et de luminescence pour la souche *S. Typhimurium UCMA 20268^{lux+}* sur 24 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait

La seule fenêtre de temps sur laquelle une corrélation positive est observée est celle comprise entre 2 et 7,5 heures (Figure 35) avec une valeur du coefficient de corrélation de 0,91. En dehors de cette fenêtre, correspondant à la phase exponentielle, il semble difficile de relier luminescence et croissance.

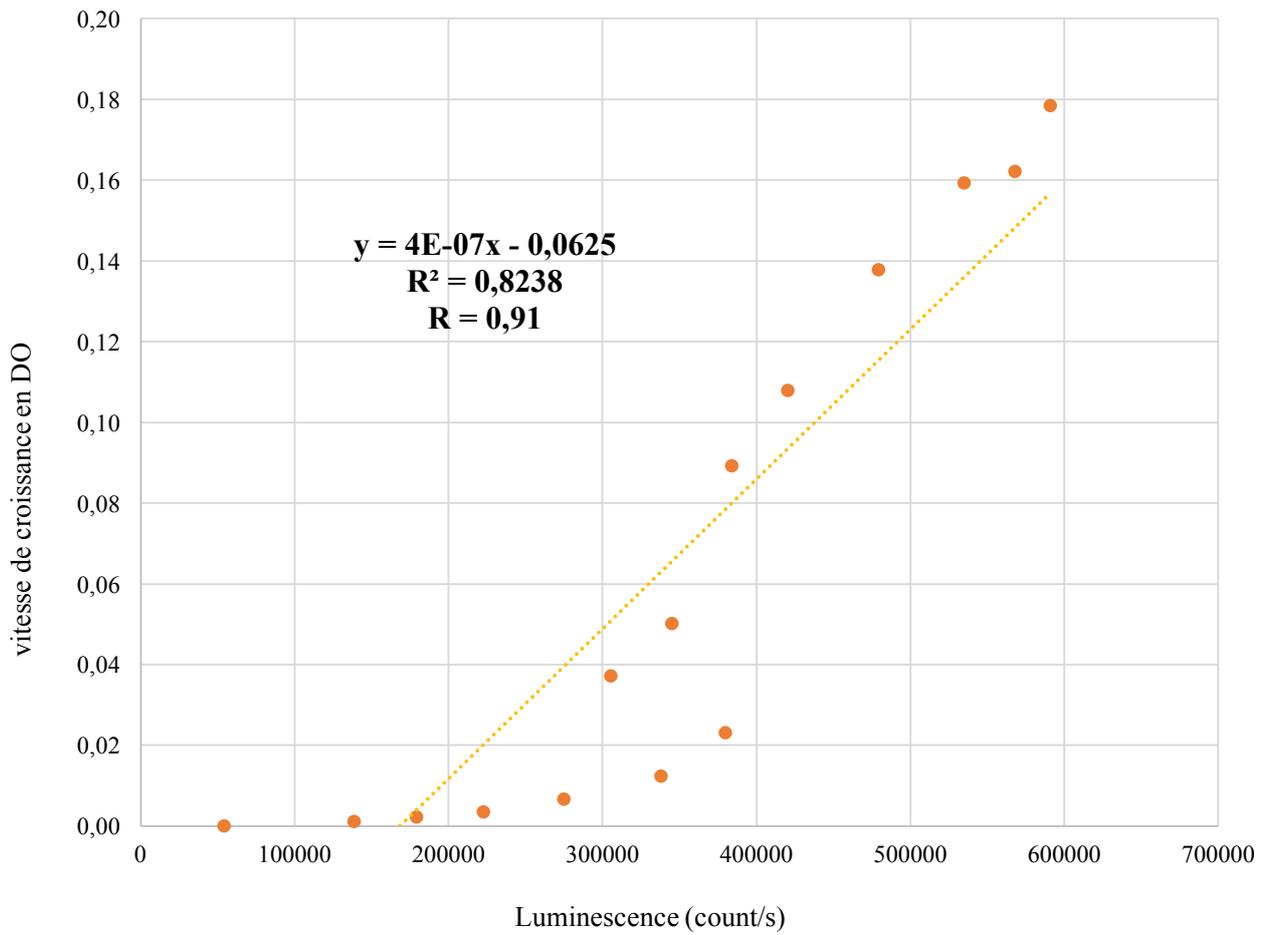


Figure 35 : Corrélation entre vitesse de croissance et de luminescence pour la souche *S. Typhimurium UCMA 20268^{lux+}* entre 2 et 7,5 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait

La figure 36 représente l'évolution de la vitesse de croissance en DO et de la luminescence en fonction du temps pour la souche *S. Mbandaka UCMA 20269^{lux+}*. Un décalage de 1-2 heures a été observé entre la diminution de la vitesse de croissance et la diminution de la luminescence, cette dernière étant plus progressive.

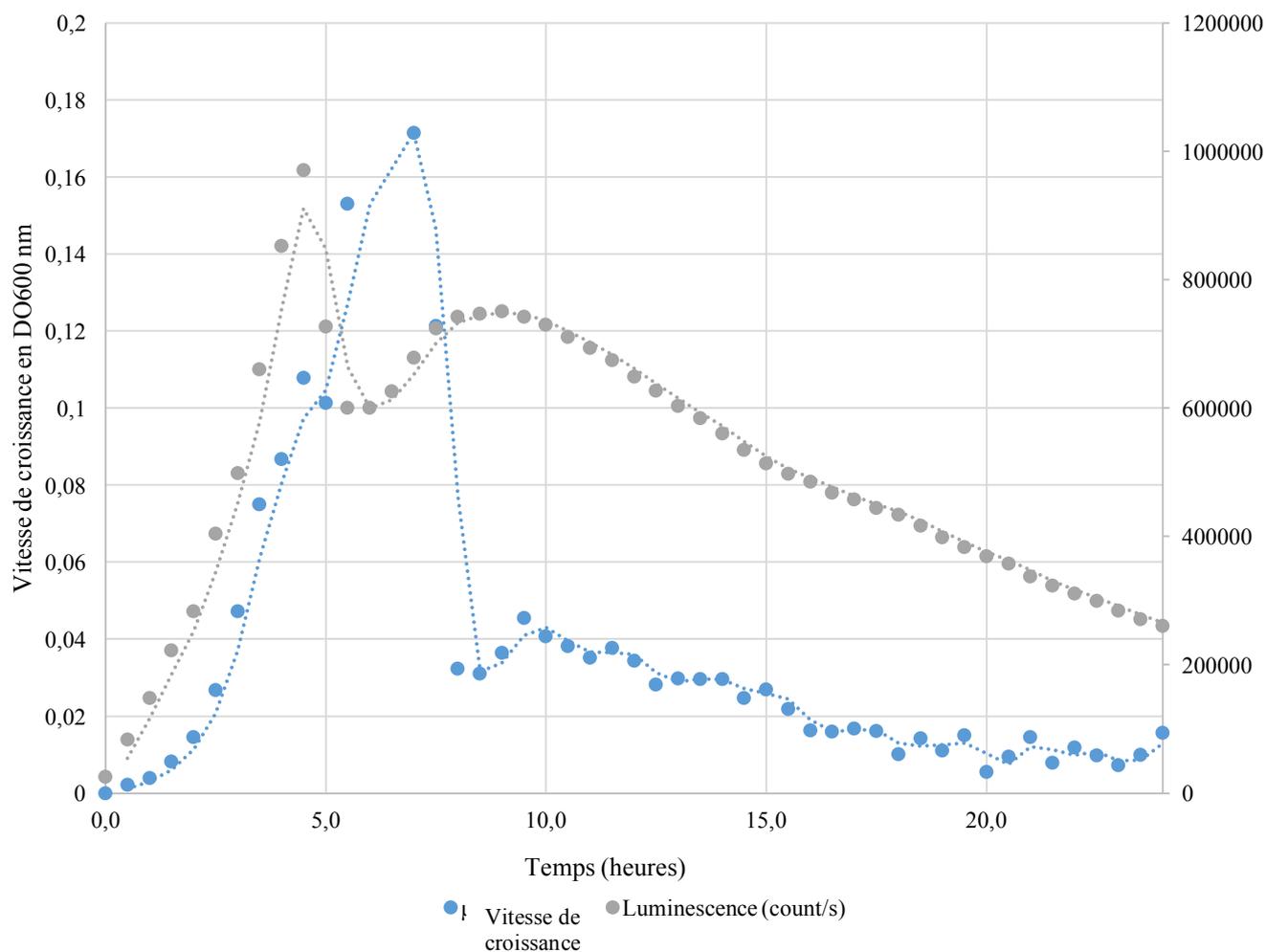


Figure 36 : Représentation du suivi de DO et de luminescence pour la souche *S. Mbandaka UCMA 20269^{lux+}* en milieu chimiquement défini lait

Si le coefficient de corrélation entre vitesse de croissance et luminescence évalué reste faible ($r = 0,63$) (Figure 37), une corrélation positive sur la fenêtre comprise entre 8 et 24 heures est observée avec une valeur du coefficient de corrélation égale à 0,91 avec la souche *S. Mbandaka UCMA 20269^{lux+}* (Figure 38).

Néanmoins, une valeur plus haute du coefficient de corrélation est observée ($r = 0,63$) sur les 24 heures en comparaison avec la souche *S. Typhimurium UCMA 20268^{lux+}*.

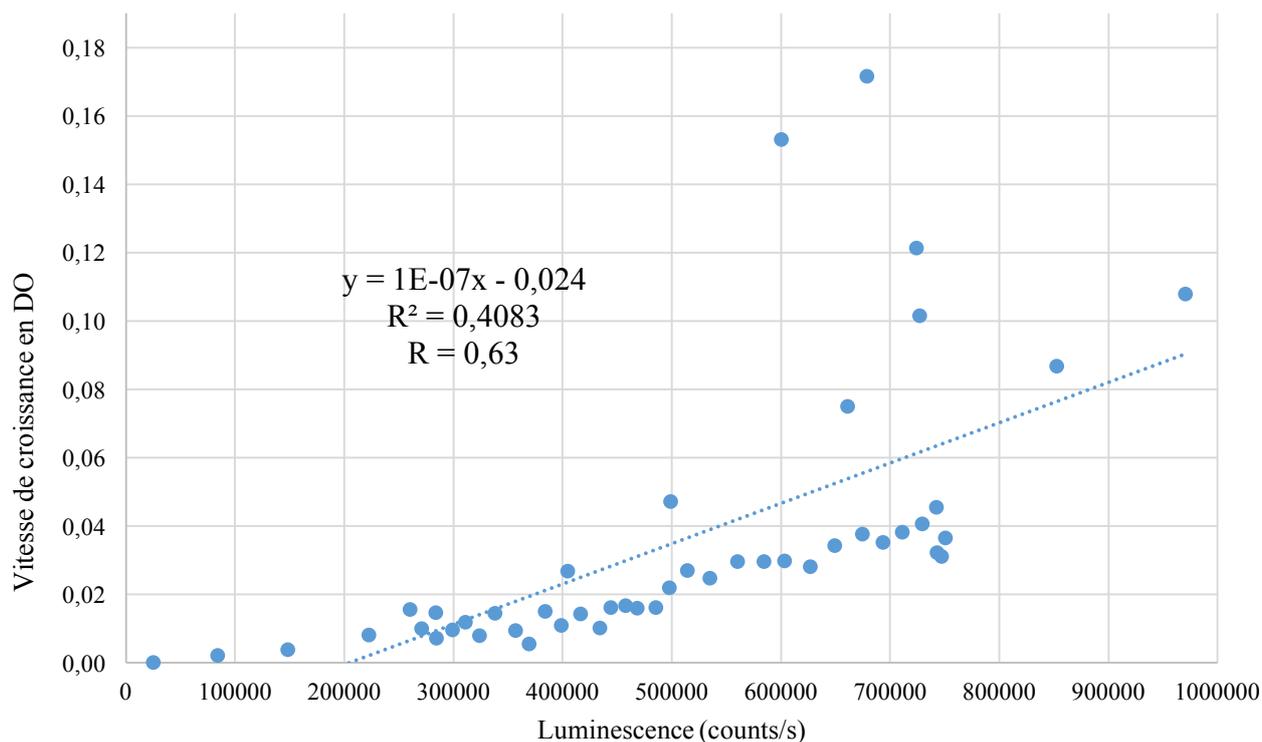


Figure 37 : Corrélation entre vitesse de croissance de luminescence pour la souche *S. Typhimurium* UCMA 20268^{lux+} sur 24 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait

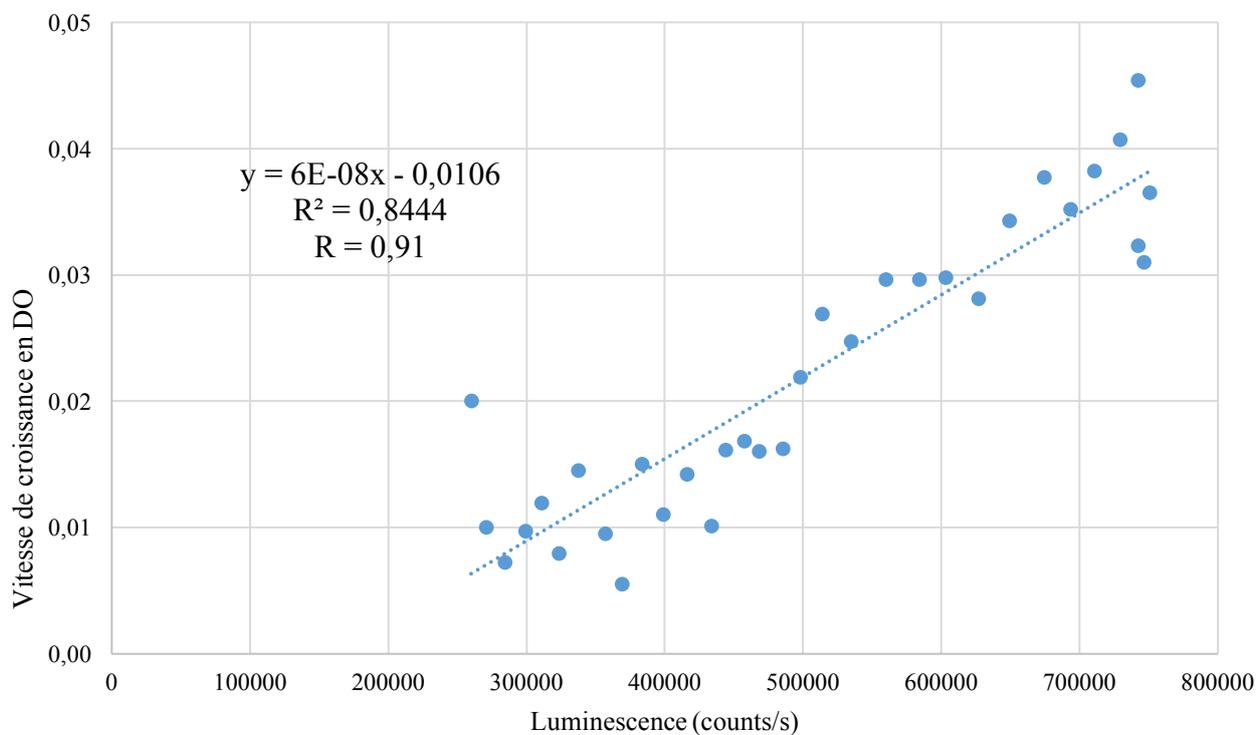


Figure 38 : Corrélation entre vitesse de croissance de luminescence pour la souche *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+} entre 8 et 24 heures de croissance en milieu chimiquement défini lait

La valeur seuil de corrélation pour la luminescence, pour *S. Typhimurium* UCMA 20268^{lux+} (fenêtre de 2 à 7,5 heures) et *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+} (fenêtre de 8 à 24 heures), était située aux alentours de 20 000 counts/s. La valeur maximale de luminescence était elle située aux alentours de 700 000 counts/s. Nous avons déterminé à partir de cela un seuil de luminescence résiduel grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{Luminescence à vitesse de croissance seuil}}{\text{Luminescence à taux de croissance maximum}} = \frac{20\ 000}{700\ 000} = 0,29 \text{ soit } 2,9\%$$

Pour la suite des expériences, un ratio de luminescence inférieur à 5% (luminescence résiduelle) a été retenu comme seuil en dessous duquel les souches à cribler seraient considérées comme inhibitrices vis-à-vis de *Salmonella* (inhibition de *Salmonella* d'au moins 95% par rapport au témoin seul).

2.3. Criblage en milieu liquide chimiquement défini

Afin d'éviter une inhibition par effet pH, les deux milieux de culture chimiquement définis ont été tamponnés. Les 414 isolats sélectionnés pour le criblage sont ceux qui étaient non inhibiteurs sur la première méthodologie de criblage.

2.3.1. Criblage en milieu lait chimiquement défini

En milieu chimiquement défini lait, parmi les 414 isolats testés, 138 isolats étaient actifs sur au moins une des deux souches. Si l'on regarde pour chaque sérovar, la grande majorité des isolats actifs appartiennent au genre *Lactococcus*.

Le tableau 47 liste les genres représentés par des isolats actifs sur au moins une des deux souches de *Salmonella* testées. Chaque isolat a été testé en duplicata et la moyenne de la luminescence a été calculée. Les genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* représentent une grande majorité des isolats testés. Comme pour la première méthode de criblage, le genre le plus actif est *Lactococcus* avec plus de la moitié des isolats testés actifs contre au moins une souche de *Salmonella*. Malgré un nombre important d'isolats criblés, peu du genre *Lactobacillus* sont actifs. En effet sur les 138 testés, seulement trois sont actifs contre *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+} et *S. Typhimurium* UCMA 20268^{lux+} (isolats identiques). Parmi les autres genres testés tels que *Pseudomonas*, *Brevibacterium* ou encore *Staphylococcus*, aucun n'a montré d'activité anti-*Salmonella* dans ces conditions malgré une croissance des isolats.

Tableau 47 : Répartition par genre des isolats actifs en milieu chimiquement défini lait

Genre présumé	Nombre d'isolats testés	S. Mbandaka	S. Typhimurium
		UCMA 20269 ^{lux+}	UCMA 20268 ^{lux+}
		(% par rapport au nombre d'isolats testés)	
<i>Candida</i>	2	0	1 (50)
<i>Enterococcus</i>	6	2 (33,3)	3 (50)
<i>Lactobacillus</i>	139	3 (2,1)	3 (2,1)
<i>Lactococcus</i>	210	116 (55,2)	128 (60,9)
<i>Leuconostoc</i>	12	1 (8,3)	1 (8,3)
Autres isolats ^a	45	0	0
Nombre total d'isolats ^a	414	122	136

^a*Brachybacterium* (2), *Brevibacillus* (1), *Brevibacterium* (1), *Carnobacterium* (1), *Corynebacterium* (2), *Cryptococcus* (1), *Curtobacterium* (1), *Cutaneotrichosporon* (1), *Debaryomyces* (2), *Dietzia* (1), *Exiguobacterium* (1), *Hafnia* (1), *Jeotgalicoccus* (1), *Kluyveromyces* (1), *Kocuria* (3), *Macroccoccus* (2), *Microbacterium* (2), *Ochrobactrum* (2), *Pediococcus* (1), *Pichia* (2), *Pseudoclavibacter* (1), *Pseudomonas* (3), *Psychrobacter* (2), *Renibacterium* (1), *Rothia* (1), *Staphylococcus* (3), *Stenotrophomonas* (1), *Streptococcus* (2) *Trichosporon* (1) et *Weilsella* (1)

2.3.2. Criblage en milieu fromage chimiquement défini

En milieu fromage une diminution est constatée avec 80 isolats actifs contre au moins une souche de *Salmonella*. Le tableau 48 rassemble le nombre d'isolats actifs sur les deux souches de *Salmonella* testées. Comme en milieu lait, c'est le genre *Lactococcus* qui est le plus actif. Cependant la proportion des isolats actifs dans ce milieu est beaucoup plus faible avec seulement 30%. Cela pourrait s'expliquer par la différence de concentration en lactose, en acide lactique mais également par une température beaucoup plus faible avec 15°C contre 30°C pour le milieu chimiquement défini lait.

Tableau 48 : Représentation du genre des isolats actifs en milieu chimiquement défini fromage

Genre présumé	Nombre d'isolats testés	S. Mbandaka	S. Typhimurium
		UCMA 20269 ^{lux+}	UCMA 20269 ^{lux+}
<i>Enterococcus</i>	6	2 (33,3)	1 (16,6)
<i>Lactobacillus</i>	139	2 (1,4)	3 (2,1)
<i>Lactococcus</i>	210	63 (30)	55 (26,2)
<i>Pseudomonas</i>	3	0	1 (33,3)
Autres isolats ^a	45	0	0
Nombre total d'isolats	414	67	60

^a*Brachybacterium* (2), *Brevibacillus* (1), *Brevibacterium* (1), *Candida* (2), *Carnobacterium* (1), *Corynebacterium* (2), *Cryptococcus* (1), *Curtobacterium* (1), *Cutaneotrichosporon* (1), *Debaryomyces* (2), *Dietzia* (1), *Exiguobacterium* (1), *Hafnia* (1), *Jeotgalicoccus* (1), *Kluyveromyces* (1), *Kocuria* (3), *Leuconostoc* (12), *Macroccoccus* (2), *Microbacterium* (2), *Ochrobactrum* (2), *Pediococcus* (1), *Pichia* (2), *Pseudoclavibacter* (1), *Psychrobacter* (2), *Renibacterium* (1), *Rothia* (1), *Staphylococcus* (3), *Stenotrophomonas* (1), *Streptococcus* (2) *Trichosporon* (1) et *Weilsella* (1)

2.3.3. Bilan des souches actives

Parmi les souches actives en milieu chimiquement défini (lait et/ou fromage) le genre *Lactococcus* est majoritairement représenté avec 136 isolats actifs sur au moins une souche, suivi des genres *Lactobacillus* (quatre), *Enterococcus* (trois), *Candida* (un), *Leuconostoc* (un) et *Pseudomonas* (un) (Tableau 49). Parmi ces isolats 39 ont été capables d'inhiber les deux *Salmonella* sur les deux milieux : 36 *Lactococcus lactis*, deux *Lactobacillus casei* et un *Enterococcus faecalis*.

Tableau 49 : Bilan des souches actives avec la méthode en milieu chimiquement défini liquide

Genre présumé	Nombre d'isolats actifs
<i>Candida</i>	1
<i>Enterococcus</i>	3
<i>Lactobacillus</i>	4
<i>Lactococcus</i>	136
<i>Leuconostoc</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	1
Nombre total d'isolats	146

Ce criblage en milieu liquide chimiquement défini a permis de sélectionner d'autres isolats ayant un mécanisme d'action différent de la production de composés ou produisant des composés actifs dans ces conditions alors qu'ils ne l'étaient pas dans les conditions du premier criblage. Le genre *Lactococcus* prédomine parmi les isolats inhibiteurs. En plus de la production de composés il semblerait que ce genre soit capable d'impacter de manière délétère l'activité métabolique de *Salmonella*.

3. Mise en évidence des mécanismes mis en jeu par les souches sélectionnées

3.1. Nature des molécules produites

3.1.1. Activité des surnageants en microplaque

Afin d'évaluer la nature des molécules potentiellement mises en jeu lors du criblage 1, il a été nécessaire de revenir à une approche en milieu liquide. L'activité des surnageants issus des isolats sélectionnés sur la première méthode de criblage a été mise en évidence à l'aide des milieux chimiquement définis lait et fromage. Les 20 isolats actifs en milieu gélosé lait ont été mis en culture en milieu chimiquement défini lait, et les 23 isolats actifs en gélosé fromage ont été mis en culture en milieu chimiquement défini fromage. Ces tests ont été réalisés contre la souche *S. Mbandaka* CIP

105.859. En effet dans le cadre du projet ainsi que de la problématique au moment de cette étude, ainsi que par les résultats de corrélations entre la vitesse de croissance et de la luminescence, seule la souche du sérovar Mbandaka a été conservée.

La figure 39 représente l'activité des surnageants de culture des isolats en fonction des conditions de traitement. Le surnageant de 17 isolats réduisait la croissance de *Salmonella* Mbandaka d'au moins 90% par rapport à la croissance de la souche seule.

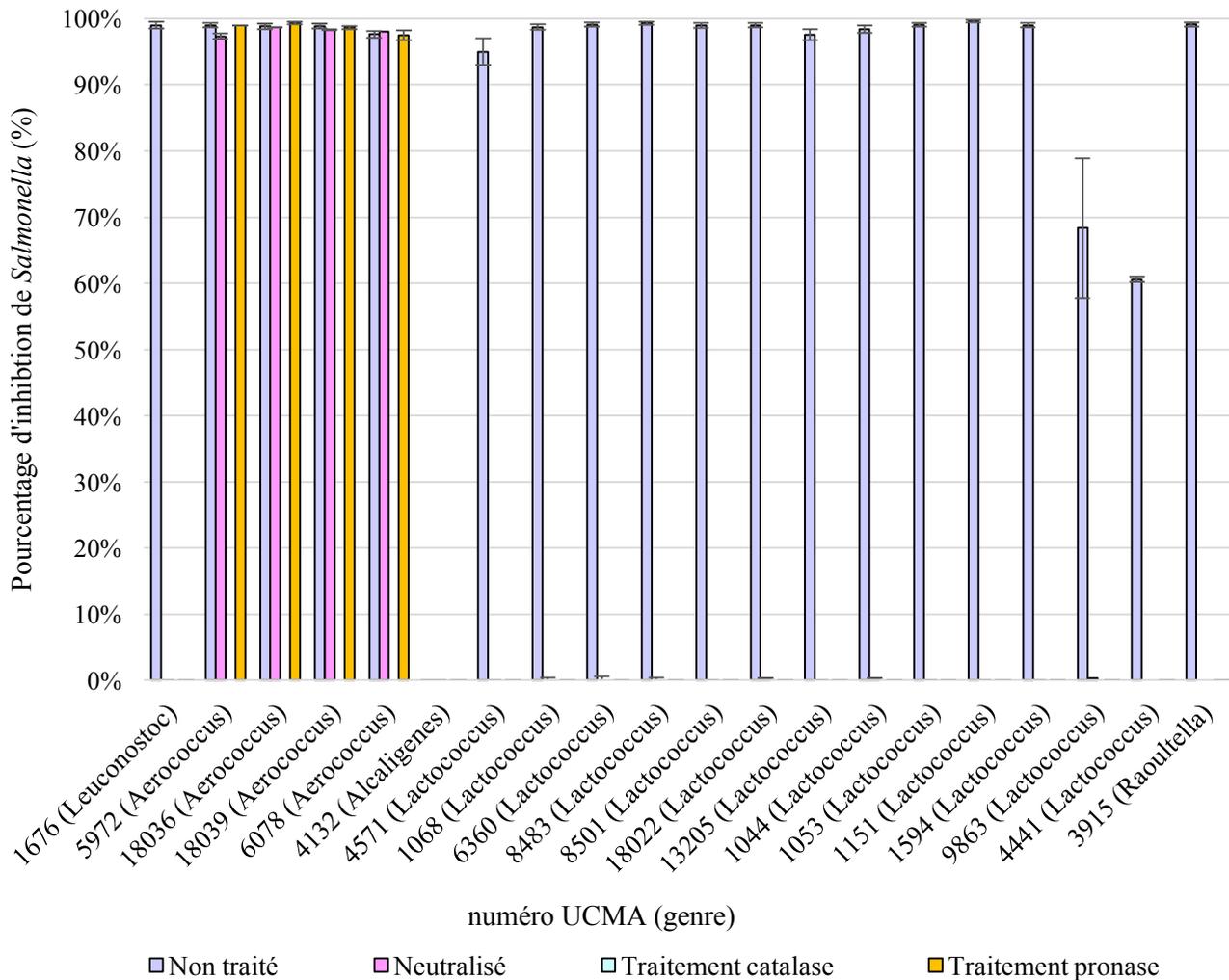


Figure 39 : Pourcentage d'inhibition de la croissance de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.851 par les surnageants des souches cultivées en milieu lait chimiquement défini

Une fois neutralisés, les surnageants de la plupart des isolats ont perdu leur activité. Cela suggère un mécanisme d'action lié à la production d'acides organiques pour les autres isolats. Seulement les quatre isolats du genre *Aerococcus* conservaient leur activité anti-*Salmonella*.

Suite au traitement à la catalase, l'activité inhibitrice des *Aerococcus* n'a pas été retrouvée. Pour les quatre isolats du genre *Aerococcus* cela suggère la production de peroxyde d'hydrogène.

Afin de mettre en évidence la production de peroxyde d'hydrogène une quantification approximative a été obtenue à l'aide de bandelettes. Dans le surnageant des quatre isolats à ne pas être affectés du genre *Aerococcus*, de l'H₂O₂ à une concentration comprise entre 30 et 100 mg/L a été observé.

Le traitement à la pronase n'affecte pas l'activité inhibitrice des quatre *Aerococcus*. Cela implique que les mécanismes d'action ne sont pas liés à des molécules protéiques.

Le « drop collapse assay » n'a montré aucune variation dans la forme de la goutte pour tous les isolats. L'activité inhibitrice des *Aerococcus* ne semble pas ici reliée à la production de biosurfactants.

Les surnageants des 23 isolats en milieu chimiquement défini fromage n'ont montré aucune activité inhibitrice supérieure à 70%. Pour la majorité des surnageants l'inhibition était comprise entre 10 et 30% de la croissance de *Salmonella*. Cela s'explique en grande partie par une croissance très faible des isolats en milieu chimiquement défini fromage et aux conditions d'incubation (15°C).

3.1.2. Détection des acides organiques par HPLC

L'analyse des surnageants obtenus en milieu chimiquement défini lait a permis d'évaluer la concentration en acide lactique et acétique mais également de mettre en évidence d'autres molécules produites. La figure 40 montre les différentes concentrations en acides lactique et acétique produites.

Concernant l'acide lactique une production est observée par les isolats du genre *Lactococcus* (entre 3,22 et 7,22 g/L), *Raoultella* (4,45 g/L) et *Leuconostoc* (6,50 g/L). Aucune production n'est détectée pour les genres *Aerococcus* et *Alcaligenes*.

L'acide acétique est produit par toutes les souches à des concentrations variables. Les genres avec les plus fortes productions sont *Lactococcus* avec des concentrations pouvant aller jusqu'à 1,92 g/L et *Raoultella* avec 1,25 g/L.

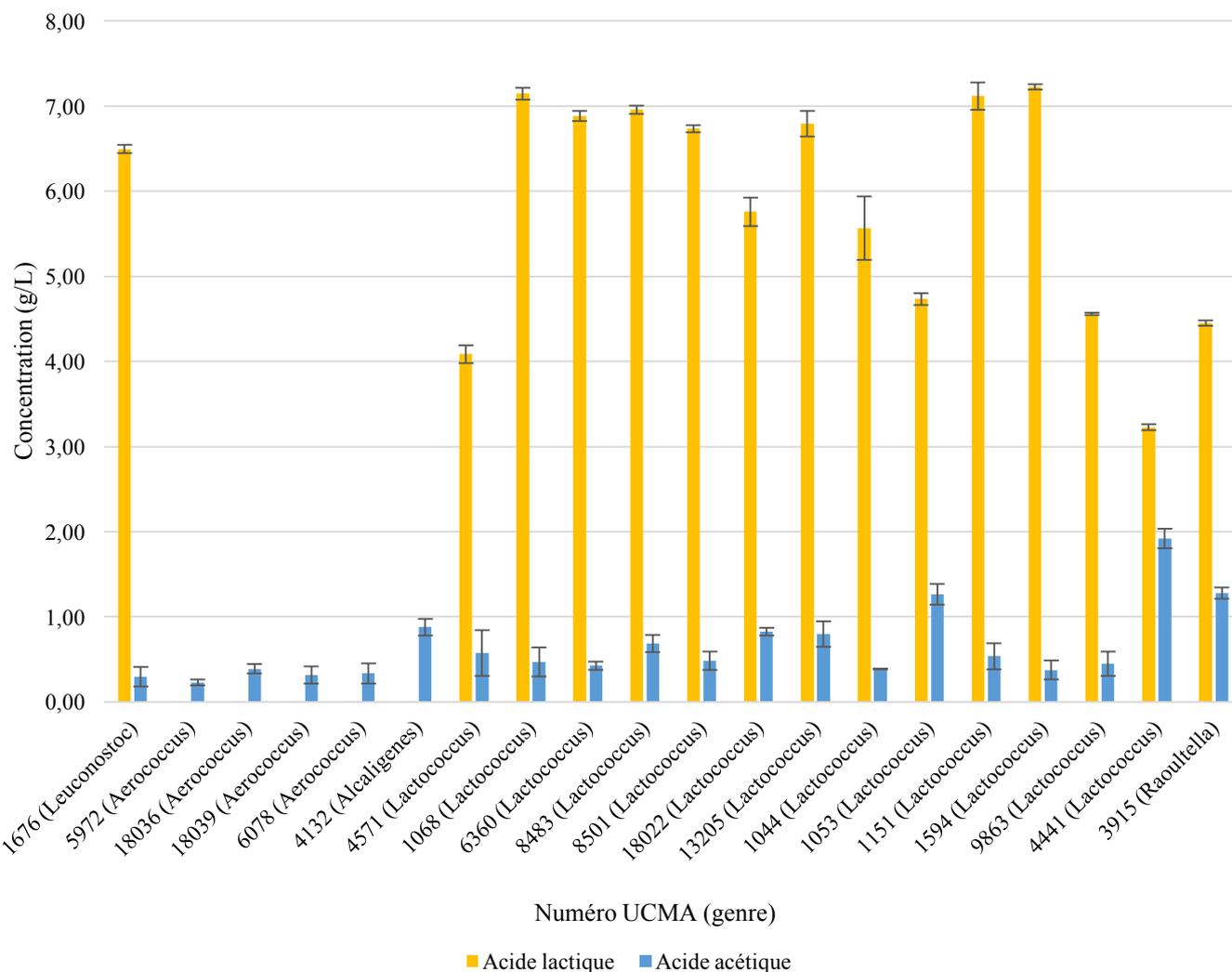


Figure 40 : Représentation de la production d'acide lactique et acétique des surnageants en milieu chimiquement défini lait

D'autres pics non identifiés ont également pu être mis en évidence. La figure 41 répertorie les différents pics en fonction de leurs aires ainsi que de leurs temps de sortie (minutes). Un pic très important est observé à 9,1 min qui n'a pas pu être identifié au moment de la rédaction de ce manuscrit. Il serait intéressant d'identifier la molécule présente car elle semble ici spécifique au genre *Aerococcus* et présente à de fortes concentrations. Aucun des acides testés comme standard (citrique, fumarique, formique, butyrique, benzoïque, succinique et phényl-lactique) n'a pu mettre en évidence la nature des molécules produites sauf pour le pic à 13,4 min correspondant à l'acide succinique, et produit par le genre *Raoultella*.

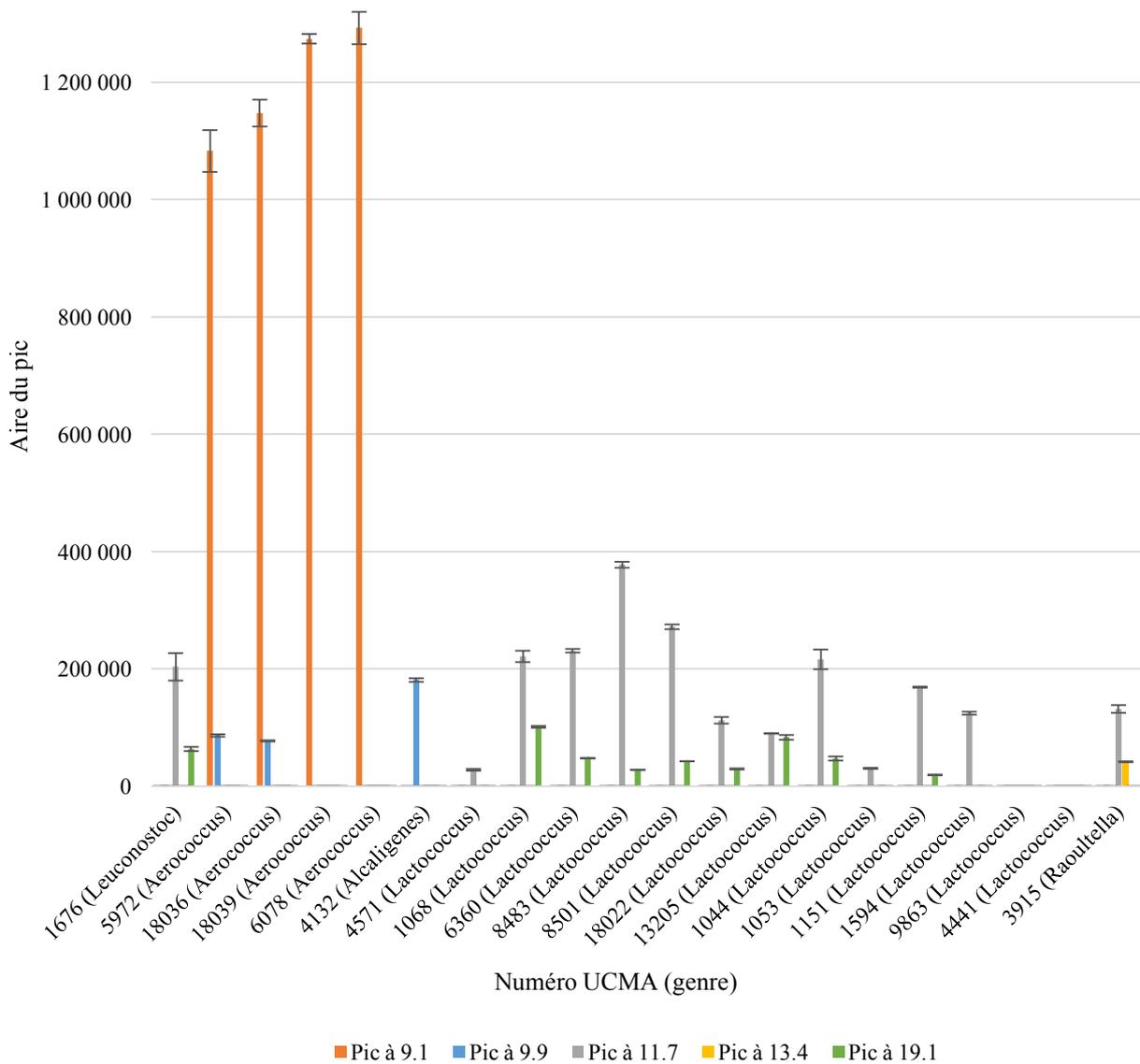


Figure 41 : Représentation des autres pics observés par HPLC dans les surnageants obtenus en milieu chimiquement défini lait

La figure 42 représente les valeurs de pH obtenues après croissance des isolats. Une diminution du pH est constatée, passant de 6,3 à 4,7-5 pour les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Raoultella*. Le pH pour les genres *Aerococcus* et *Alcaligenes* est similaire à celui du milieu seul. Cela est cohérent avec l'absence de production d'acide lactique et interroge donc sur la nature de la molécule sortant à 9,1 minutes.

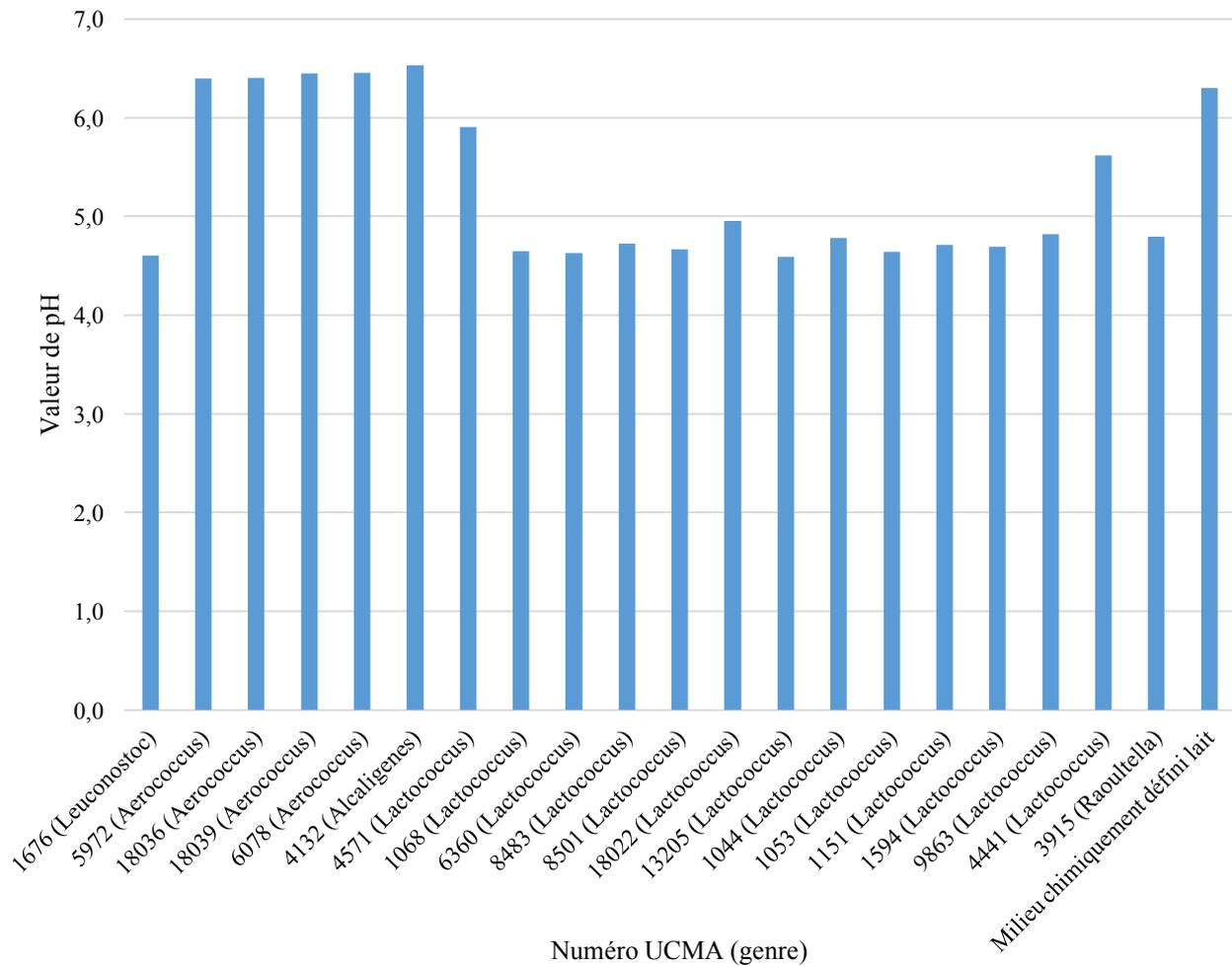


Figure 42 : Valeurs de pH des isolats en milieu chimiquement défini lait

L'analyse des surnageants des souches cultivées en milieu chimiquement défini fromage n'a montré aucune différence avec l'analyse du milieu seul ce qui est en accord avec l'absence d'inhibition de la souche de *Salmonella* par les surnageants.

Dans cette étude la majorité des souches criblées pour la production de composés montrent une perte d'activité lors de la neutralisation du surnageant. Ces souches faisant, pour la plupart, partie de la famille des bactéries lactiques, cela confirme les différentes études montrant que leur inhibition s'effectue majoritairement par la production d'acides organiques. L'acide lactique, composé majoritairement produit par les bactéries lactiques lors de la fermentation (Gottschalk, 1986), est notamment retrouvé. Le genre *Lactococcus* est celui avec la production la plus importante, pouvant atteindre 7,22 g/L pour la souche UCMA 1594 de l'espèce *L. lactis*. Cette production d'acide lactique est souvent concomitante avec une baisse du pH, permettant d'accroître le spectre ainsi que le pouvoir inhibiteur. En effet une étude a mis en évidence une inhibition de *Salmonella* en présence d'acide lactique à des pH inférieurs à 4,4 et en présence d'acide acétique à un pH de 5,4 (Goepfert and Hicks,

1969). Cette relation a pu être observée ici avec des pH beaucoup plus faibles par rapport au milieu initial, notamment pour les genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*.

Une production, beaucoup plus faible, d'acide acétique est observée. Bien que présent à des concentrations allant seulement jusqu'à 1,92 g/L pour la souche UCMA 4441 de l'espèce *L. lactis*, cet acide possède un pouvoir inhibiteur plus important que l'acide lactique. En effet sa constante de dissociation est de 4,7 alors que celui de l'acide lactique est de 3,8. A un pH faible, la forme non dissociée est plus présente pour l'acide acétique. La production de ces deux acides peut également aboutir à une synergie de l'inhibition. Dans leur étude, Adams et Hall ont montré une synergie entre l'acide lactique et acétique contre *Salmonella* Enteritidis due à l'acidification du milieu par l'acide lactique permettant d'augmenter la forme non dissociée de l'acide acétique et donc son pouvoir inhibiteur (Adams and Hall, 1988). Cet effet synergique pourrait expliquer que malgré sa concentration en acide acétique importante, l'effet antagoniste du surnageant de l'isolat UCMA 4441 n'avait atteint que 60%. Cela pourrait être corrélé avec le fait que sa concentration en acide lactique est la plus basse en comparaison aux autres isolats du même genre (3,22 g/L).

La production d'autres acides a été observée grâce à l'analyse HPLC, avec notamment l'acide succinique produit par la souche UCMA 3915 de l'espèce *Raoultella planticola*. Ce résultat est en accord avec l'évaluation de la productions d'acides organiques par une autre espèce lors de la fermentation, *R. ornithinolytica*, par laquelle il a été mis en évidence la production d'acides acétique, lactique et succinique (Kim et al., 2016).

En plus de la production d'acides organiques, la production d'un autre type de molécule a été caractérisé pour le genre *Aerococcus*, le peroxyde d'hydrogène. Ici une production comprise en 30 et 100 mg/L pour tous les isolats de ce genre est observée. Cette production de peroxyde d'hydrogène est déjà connue. En effet, chez *A. viridans*, la décarboxylation du pyruvate par l'action de la pyruvate oxydase permet la production de cette molécule via la réduction du dioxygène (Yanze Kontchou and Blondeau, 1990). La glycérophosphate oxydase isolée de souches de la même espèce est également capable de contribuer à la formation de peroxyde d'hydrogène (Streitenberger et al., 2001).

3.2. Recherche de nutriments potentiellement impliqués dans une interaction nutritionnelle

Afin de cibler l'un des sérovars prédominant dans l'environnement laitier normand au moment de ce travail, les analyses de levée d'inhibition ont été effectuées sur la souche UCMA 20269^{lux+} (sérovar Mbandaka). Les isolats ont été sélectionnés lorsqu'une levée d'inhibition a été observée dans seulement un des quatre milieux modifiés testés à la fois afin de réduire le nombre d'isolats sélectionnés. Notre étude se base ici sur les précédentes observations d'inhibitions

sélectionnées grâce à la méthodologie de criblage numéro 2. Notre hypothèse étant la mise en évidence d'une compétition nutritionnelle, les milieux chimiquement définis ont été supplémentés afin de mettre en évidence une levée d'inhibition, c'est-à-dire une restauration du signal luminescent identique à celui du témoin *Salmonella* seul.

3.2.1. Milieu lait chimiquement défini

Le tableau 50 ci-dessous représente la levée d'inhibition de la souche *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} en milieu chimiquement défini lait modifié. Le symbole « + » représente une levée d'inhibition de la souche en co-culture avec un isolat (restauration d'au moins 90% de la luminescence par rapport au témoin seul). Une levée d'inhibition dans un seul des milieux modifiés est observée pour 22 isolats. Presque tous les isolats appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis*, exceptées la souche UCMA 1619 appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis* ainsi que la souche UCMA 1343 appartenant à l'espèce *Lactococcus laudensis*.

Dans le milieu avec une concentration en vitamines de 2X une levée d'inhibition est observée avec cinq isolats appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis*. Aucune levée d'inhibition n'est constatée pour le milieu avec les acides aminés en concentration 2X. Pour les minéraux, une levée d'inhibition de *Salmonella* est observée en co-culture avec six isolats appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis*. Enfin, pour 11 isolats dont une souche d'*Enterococcus faecalis*, une souche de *Lactococcus laudensis* et neuf souches de *Lactococcus lactis* une levée d'inhibition a été obtenue en milieu modifié avec une concentration 2X en acide lactique.

Tableau 50 : Levées d'inhibition de *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} en milieu lait chimiquement défini modifié par la supplémentation en divers nutriments

Souche (n° UCMA)	Espèce	Milieu chimiquement défini lait			
		Vitamines 2X	Acides aminés 2X	Minéraux 2X	Acide lactique 2X
1491	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1540	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1544	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1546	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1670	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1142	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1481	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1501	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1557	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1605	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1609	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1067	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1128	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1131	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1521	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1148	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1574	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1596	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1619	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+
1684	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1343	<i>L. laudensis</i>	-	-	-	+
3065	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+

+ : levée d'inhibition

- : pas de levée d'inhibition

L. : *Lactococcus*, *E.* : *Enterococcus*

3.2.2. Milieu fromage chimiquement défini

En milieu fromage, une levée d'inhibition de *Salmonella* est observée en co-culture avec 30 isolats dans au moins un des milieux modifiés. Parmi ces isolats, 25 appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis*, deux à *Enterococcus faecalis*, un à *Lactococcus chungangensis* un à *Kluyveromyces* sp. et un isolat de l'espèce *Lactococcus laudensis*. Le tableau 51 met en évidence les différentes levées d'inhibitions est constatées.

En milieu supplémenté en vitamines, cinq isolats permettent une levée d'inhibition dont trois *Lactococcus lactis*, un *Kluyveromyces lactis* et un *Enterococcus faecalis*. En milieu supplémenté en acides aminés, cinq isolats appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* (quatre) et *Enterococcus faecalis* (un) ne sont plus inhibiteurs de *Salmonella*. En milieu supplémenté en minéraux, neuf isolats appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* (huit) et un *Lactococcus laudensis* ont vu leur pouvoir inhibiteur levé. Enfin, en milieu modifié contenant une concentration deux fois plus importante en

acide lactique, une levée d'inhibition a été détectée pour 11 isolats, tous les isolats appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis*.

Tableau 51 : Levées d'inhibition de *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} en milieu chimiquement défini fromage modifié

Numéro UCMA	Espèce	Milieu chimiquement défini fromage			
		Vitamines 2X	Acides aminés 2X	Minéraux 2X	Acide lactique 2X
1043	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1123	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1497	<i>L. lactis</i>	+	-	-	-
1120	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-
11475	<i>K. lactis</i>	+	-	-	-
1129	<i>L. lactis</i>	-	+	-	-
1130	<i>L. lactis</i>	-	+	-	-
1131	<i>L. lactis</i>	-	+	-	-
1599	<i>L. lactis</i>	-	+	-	-
1619	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-
1142	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1143	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1148	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1474	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1477	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1478	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1500	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1643	<i>L. chungangensis</i>	-	-	+	-
1655	<i>L. lactis</i>	-	-	+	-
1066	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1073	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1076	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1077	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1086	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1092	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1112	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1113	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1121	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1125	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+
1684	<i>L. lactis</i>	-	-	-	+

+ : levée d'inhibition

- : pas de levée d'inhibition

Cette seconde méthode de criblage a permis de sélectionner des candidats sans inhibition sur la méthode par amensalisme et/ou antibiose, afin d'évaluer les interactions lors d'une co-culture avec *Salmonella*. L'intérêt était d'évaluer l'impact de certaines catégories de nutriments présents en matrice laitière sur des isolats inhibiteurs de *Salmonella*. En effet, l'étude bibliographique a souligné

l'importance des vitamines dans la croissance des micro-organismes mais aussi leurs concentrations limitantes dans la matrice laitière et fromagère. L'hypothèse pouvant être émise est que ces éléments pourraient intervenir en tant que facteurs d'enjeux de la compétition nutritionnelle.

Lors de co-culture en milieu chimiquement défini lait et fromage supplémentés, une levée d'inhibition est constatée majoritairement dans le milieu deux fois plus concentré en acide lactique. Cela pourrait être expliqué par les résultats obtenus lors du criblage sur plaque GEN III. En effet il a été constaté que dans un milieu minimum et en présence d'acide lactique à 1% les 16 souches de *Salmonella* testées était capables de croître. Dans le lait il pourrait être présent à des concentrations limitantes et donc être un levier dans la levée d'inhibition de *Salmonella* UCMA 20269^{lux+}. Cela montre également que les phénomènes mis en évidence ne semblent pas toujours être liés à une compétition nutritionnelle directe puisqu'une compétition avec les bactéries lactiques pour cette molécule semble exclue. L'impact de la modification de la concentration en vitamines, acides aminés et minéraux a été mis en évidence ici. Pour certains isolats une levée d'inhibition est observée dans l'une de ces conditions.

Les mécanismes d'action mis en évidence par cette méthodologie ne sont pas encore déterminés. Cependant une hypothèse serait un mécanisme via la compétition pour les nutriments présents en concentration limitante dans la matrice tels que les vitamines, les minéraux et les acides aminés. La majorité des isolats sélectionnés par cette méthode appartiennent à la famille des bactéries lactiques. Bien que caractérisée sur d'autres pathogènes, la compétition nutritionnelle par des membres de cette famille a déjà été montrée. L'acide nicotinique (vitamine B3), présent dans le lait a été mis en évidence comme enjeu de compétition nutritionnelle entre *Staphylococcus aureus* et *Lactococcus lactis* (Iandolo et al., 1965). Une autre étude a également montré une compétition nutritionnelle entre ces deux espèces pour des sources telles que le glucose, l'extrait de levure et le tryptone) (Haines and Harmon, 1973). Cette compétition peut également être retrouvée pour le glucose avec une autre bactérie lactique, *C. maltaromaticum* avec une inhibition de *L. monocytogenes* (Nilsson et al., 2005).

4. Sélection des candidats pour l'utilisation en transformation fromagère

4.1. Evaluation de la résistance à divers antibiotiques

Les isolats ont été testés pour leurs résistances aux antibiotiques à l'aide de bandelettes e-test. La souche UCMA 11475 du genre *Kluyveromyces* n'a pas été testée avec cette méthode. La souche UCMA 21105 appartenant à l'espèce *Streptococcus parauberis* connue comme pouvant provoquer des mammites fut écartée de la suite du criblage dans le cadre de ce projet.

Le tableau 52 ci-dessous répertorie les différentes résistances constatées en fonction des breakpoints ciblés. Le détail des résultats pour chacun des antibiotiques est répertorié en annexes 5 et 6. Quatorze isolats obtenus par la première méthodologie de criblage ont été écartés de par leurs résistances et 15 issus de la seconde méthodologie de criblage l'ont été.

Une résistance à la tétracycline est majoritairement observée pour l'espèce *Lactococcus lactis* avec 20 isolats, mais également une résistance à la vancomycine par quatre isolats dont deux *Lactococcus raffinolactis*, un *Lactococcus lactis* et un *Aerococcus urinaeequi*. Une résistance à l'érythromycine est observée pour deux isolats de l'espèce *L. lactis* et une résistance à la lévofloxacine pour un isolat de l'espèce *Aerococcus urinaeequi*.

Tous les isolats présentant une résistance à un antibiotique ont été éliminés de la sélection de micro-organismes bioprotecteurs pour la suite des expériences.

Tableau 52 : Résistance aux antibiotiques observées des candidats bioprotecteurs

Criblage par amensalisme et/ou antibiose		Criblage en co-culture en milieu liquide	
Numéro UCMA	Résistance (µg/mL)	Numéro UCMA	Résistance (µg/mL)
1044	Tétracycline (256)	1043	Tétracycline (256)
1049	Tétracycline (256)	1066	-
1053	-	1067	-
1068	-	1073	Tétracycline (256)
1151	-	1076	Tétracycline (256)
1495	-	1077	Tétracycline (256)
1594	-	1086	Tétracycline (256)
1676	-	1092	-
3915	-	1112	-
4132	-	1113	Tétracycline (256)
4441	Vancomycine (256)	1120	-
4512	Vancomycine (256)	1121	Tétracycline (256)
4571	Erythromycine (1,5)	1123	-
5972	-	1125	-
6078	-	1128	-
6360	Tétracycline (256)	1129	-
6472	Tétracycline (256)	1130	-
6731	-	1131	-
6761	Lévofloxacine (4)	1142	-
7402	-	1143	-
8483	-	1148	-
8501	Erythromycine (2), Tétracycline (256)	1343	-
9110	-	1474	Tétracycline (256)
9863	-	1477	Tétracycline (256)
13205	Tétracycline (256)	1478	Tétracycline (256)
18010	Tétracycline (256)	1481	Tétracycline (256)
18022	-	1491	-
18036	Tétracycline (256)	1497	Tétracycline (256)
18039	Vancomycine (256)	1500	-
21104	Vancomycine (256)	1501	-
21105	ND	1521	-
		1540	-
		1544	Tétracycline (256)
		1546	-
		1557	-
		1574	Tétracycline (256)
		1596	-
		1599	-
		1605	Tétracycline (256)
		1609	-
		1619	-
		1643	-
		1655	-
		1670	-
		1684	-
		3065	-
		11475	ND

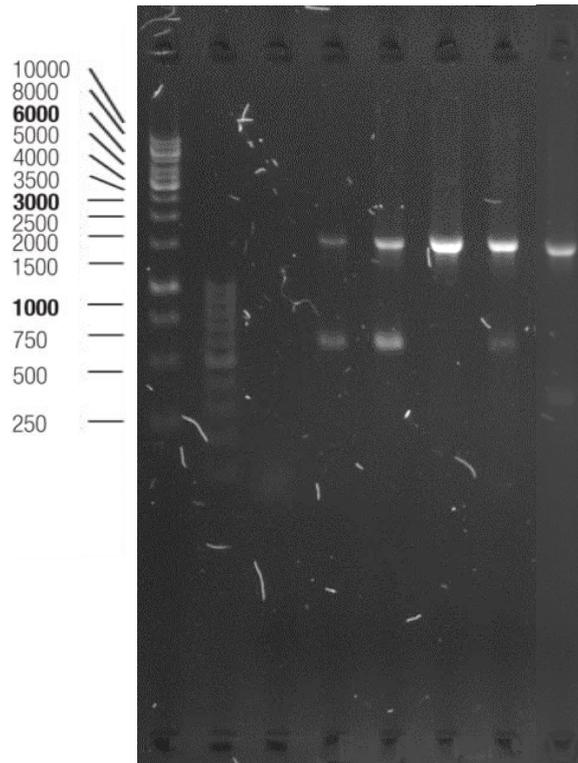
La mise en évidence de résistance aux antibiotiques pour les souches sélectionnées a permis d'écarter majoritairement des isolats résistants à la tétracycline. La grande majorité de ces isolats appartient à l'espèce *Lactococcus lactis*, déjà caractérisée dans d'autres études pour cette résistance (Zycka-Krzesinska et al., 2015). Les isolats testés dans cette étude sont issus de l'environnement laitier où la tétracycline est un antibiotique couramment utilisé pour la prophylaxie ou le traitement d'infections. En effet, de par son large spectre (bactéries à Gram négatif et positif) son utilisation est très répandue. Les gènes conférant aux bactéries une résistance à ces antibiotiques sont très nombreux et souvent retrouvés sur des éléments mobiles tels que les plasmides ou des transposons. Cette affirmation semble être confirmée ici puisque de nombreux *Lactococcus lactis* testés ont été caractérisés pour une résistance complète vis-à-vis de cet antibiotique à une concentration maximale de 256 µg/mL et pouvant correspondre à un transfert de cette résistance.

La résistance des bactéries lactiques aux autres antibiotiques tels que la vancomycine et l'érythromycine est également décrite dans une revue dédiée aux bactéries lactiques (Carr et al., 2002). Ici, pour quelques isolats, la sensibilité à ces antibiotiques dépasse les seuils préconisés par l'Eucast et l'EFSA pour être potentiellement utilisé à des fins agroalimentaires.

4.2. Potentiel de production d'amines biogènes

La détection de la production des amines biogènes tyramine, histamine, cadavérine et putrescine a été évaluée à l'aide d'un test biochimique. Parmi les 48 isolats sélectionnés, un isolat est positif pour la production d'histamine, la souche UCMA 3915 correspondant à l'espèce *Raoultella planticola* a été détecté.

Pour les souches positives avec l'arginine, la présence du gène codant pour l'enzyme agmatine déiminase, permettant la transformation de l'arginine en putrescine, fut ensuite confirmée par méthode moléculaire PCR. En effet, les souches positives pour la production d'agmatine n'ont pas toutes la capacité de produire ensuite la putrescine. La figure 43 représente le résultat obtenu après avoir effectué la PCR mettant en évidence la présence du gène de l'agmatine déiminase. Une bande à 600 bp est observée, correspondant à la présence du gène pour les deux souches témoin IOEB 9906 et 9809 ainsi que pour la souche UCMA 1128. Une bande est observée pour la souche UCMA 7402 plus basse que les autres ne correspondant à aucune des amorces ciblées et pouvant être liée à une amplification partielle d'un autre fragment. D'autres résultats PCR ayant montré le même résultat pour cette souche, elle a par précaution été écartée de la suite des expériences.



1 : marqueur 1kb, 2 : marqueur 100pb, 3 : témoin négatif, 4 : IOEB 9906, 5 : IOEB 9809, 6 : UCMA 1068 (souche négative), 7 : UCMA 1128, 8 : UCMA 7402

Figure 43 : Détection de la présence du gène de l'agmatine déiminase par méthode PCR

La production d'amines biogènes par des bactéries dans les matrices laitières et fromagères est déjà connue est décrite dans la littérature. Cette étape est essentielle dans la sélection de candidats bioprotecteurs afin de vérifier la non-altération du produit au cours de la transformation. Ici deux approches ont été utilisées : biochimique et moléculaire. L'approche PCR a permis de confirmer la présence de l'enzyme permettant la transformation de l'agmatine en putrescine, l'agmatine déiminase. Bien que ne représentant pas les conditions de la matrice laitière cette première approche a permis d'éliminer les souches potentiellement productrices d'amines biogènes. Lors de cette expérience trois isolats ont été écartés pour la suite du criblage : UCMA 1128, 7402 et 3915. Bien que le résultat PCR pour l'isolat UCMA 7402, effectué à deux reprises, ne corresponde pas à la bande spécifique du gène de l'agmatine déiminase l'isolat a été écarté pour la suite du criblage. L'hypothèse de l'apparition de ce fragment plus petit pourrait être liée à une température d'hybridation non optimale pour ce genre bactérien, résultant à une amplification incomplète lors de la PCR, traduisant un fragment plus petit sur gel.

4.3. Innocuité sur modèle larves de *Galleria mellonella*

Parmi les 45 isolats retenus après les tests de résistance aux antibiotiques et le potentiel de production d'amines biogènes, certains genres et espèces ne sont pas sur liste QPS et/ou FIL. Pour l'application en industrie alimentaire les isolats de l'espèce *Enterococcus faecalis* (deux isolats) et *Alcaligenes faecalis* (un isolat) ont été écartés.

Parmi les 42 isolats restant, deux espèces ne sont pas répertoriées dans ces listes : *Aerococcus urinaeequi* et *Lactococcus laudensis*. L'innocuité d'un isolat de chacune de ces deux espèces a été testée à la concentration de 10^8 UFC/mL contre 10 larves de *Galleria mellonella*. Les larves ont été observées à 24, 48 et 72 heures après injection.

Le tableau 53 ci-dessous représente le taux de mortalité des larves en fonction de la solution injectée. On constate que pour les deux isolats aucune larve ne meurt après 72 heures d'incubation. Egalement, un développement plus lent du cocon peut être observé, avec 24 heures pour le PBS et à partir de 48 heures pour les autres conditions. La condition témoin avec *Salmonella* Mbandaka montre une mort de toutes les larves après seulement 24 heures d'incubation.

Tableau 53 : Evaluation de la mortalité de larves de *Galleria mellonella*

Solution injectée	Mortalité larves <i>Galleria mellonella</i> (nombre)		
	T24	T48	T72
<i>Aerococcus urinaeequi</i> (UCMA 5972)	0	0	0
<i>Lactococcus laudensis</i> (UCMA 1343)	0	0	0
Témoin négatif PBS	0	0	0
Témoin positif <i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.859	10	10	10

Le tableau 54 proposé par Loh et al., met en avant plusieurs critères de validation de l'innocuité sur modèle *Galleria mellonella* pour un isolat. Une larve est considérée « saine » lors de l'obtention d'un score compris entre neuf et dix. Les scores pour les deux isolats testés sont de neuf et donc que la larve est considérée « saine » après injection. Pour le témoin *Salmonella* le score est de zéro puisqu'une mort de toutes les larves est constatée dès 24 heures.

Tableau 54: Index de score représentant la santé d'une larve *Galleria mellonella* (Loh et al., 2013)

Catégorie	Description	Score	UCMA 5972	UCMA 1343	CIP 105.859	PBS
Activité	Pas de mouvement	0			√	
	Peu de mouvement avec stimulation	1				
	Mouvement avec stimulation	2				
	Mouvement sans stimulation	3	√	√		√
Formation de cocon	Pas de cocon	0			√	
	Cocon partiel	0,5				
	Cocon complet	1	√	√		√
Mélanisation	Larve noire	0			√	
	Point noirs sur larve marron	1				
	Points noirs ≥ 3 sur larve beige	2				
	Points noirs < 3 sur larve beige	3	√	√		
	Pas de mélanisation	4				√
Survie	Mort	0			√	
	Vivante	2	√	√		√
Total			9	9	0	10

L'utilisation du modèle *Galleria mellonella* pour tester l'innocuité et/ou la pathogénicité de souches est bien connue dans la littérature. Si elle ne remplace pas une analyse complète du génome et l'évaluation de la présence de gènes de facteurs de virulence pouvant être présents, elle apporte néanmoins des informations essentielles sur la pathogénicité d'une espèce sur un système immunitaire proche de celui des vertébrés et de l'Homme notamment pour des nouveaux genres non utilisés en alimentation tel que *Aerococcus*. D'après une étude plusieurs facteurs sont à prendre en compte. En effet en plus du critère de mortalité, la formation de cocon et la mobilité des larves et la mélanisation sont des facteurs essentiels pour valider l'innocuité sur ce modèle (Tsai et al., 2016). Dans notre étude, malgré une formation de cocon un peu plus tardive en présence des deux isolats (48 heures au lieu de 24 heures), le score des isolats reste compris entre neuf et dix. L'index de score introduit par Loh et al., 2013 permet ici d'apporter une vision plus complète dans l'évaluation de l'impact des souches sur modèle *Galleria mellonella*.

4.4. Comportement des ferments fromagers en présence des candidats bioprotecteurs

4.4.1. Croissance des bactéries d'affinage et des flores bioprotectrices utilisées en fromagerie en présence des candidats bioprotecteurs

La croissance des ferments lactiques mésophiles, d'affinage et des flores protectrices a été évaluée en présence des candidats bioprotecteurs. Parmi les isolats sélectionnés seule la souche UCMA 18022 (*Lactococcus lactis*) a provoqué une inhibition du ferment d'affinage 5 avec l'apparition d'un halo d'inhibition. L'isolat fut donc écarté pour la suite du projet.

4.4.2. Suivis d'acidification en lait reconstitué

Le pouvoir acidifiant des mélanges de ferments lactiques mésophiles 1 et 2 ainsi que de la flore protectrice 1 ont été testés en lait en co-culture avec les isolats sélectionnés. Ces ferments ont été testés pour leur activité acidifiante. De par sa nature, la flore protectrice 1 a également été testée. La figure 44 représente la cinétique d'acidification des trois ferments de fromagerie en présence ou non du candidat bioprotecteur UCMA 5972 (*Aerococcus urinaeequi*). Les résultats pour tous les isolats sont répertoriés en annexe 7. Un pouvoir acidifiant modéré de la souche seule correspondant à un pH aux alentours de 5,5 après 24 heures de croissance a été observé. Une acidification plus marquée à partir de 2 heures a été observée pour la flore protectrice 1. La même chose est observée pour le ferment mésophile 2, avec une acidification un peu plus importante (0,5 unité de pH) à 18 et 24 heures en présence du candidat bioprotecteur. Il n'y a pas d'inhibition de l'acidification des ferments par les isolats testés.

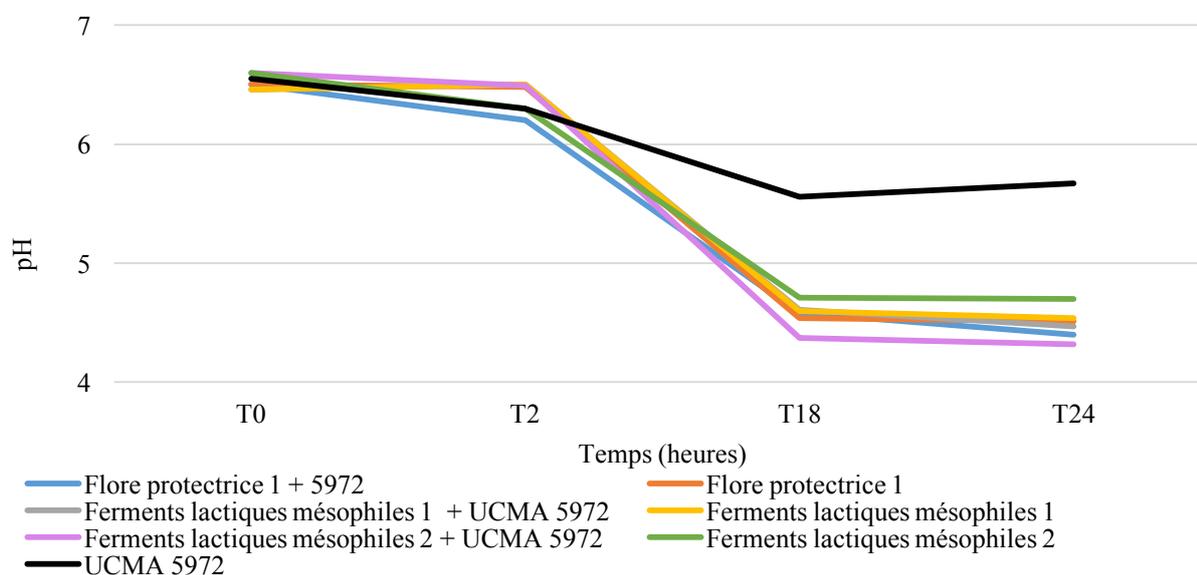


Figure 44 : Activité acidifiante en demi-écrémé de ferments en présence ou non de la souche UCMA 5972

L'évaluation du comportement des ferments en présence des isolats a permis d'écarter une souche inhibant la croissance d'un ferment. Le restant des isolats n'a pas eu d'impact négatif sur la croissance ou l'acidification de la matrice laitière.

4.5. Isolats sélectionnés

Le tableau 55 ci-dessous représente l'ensemble des isolats sélectionnés pour la création d'associations. Douze isolats sont issus du criblage par amensalisme et/ou antibiose et 29 du criblage sur milieu liquide chimiquement défini en co-cultures.

Tableau 55 : Liste des isolats sélectionnés pour la création d'associations et mécanismes d'action

Numéro UCMA)	Espèce	Activité surnageant > 80%	Activité après neutralisation	H ₂ O ₂ production (mg/L)	Acide lactique
5972	<i>A. urinaeequi</i>	+	+	30-100	0
6078	<i>A. urinaeequi</i>	+	+	30-100	0
6731	<i>A. urinaeequi</i>	nd	nd	nd	nd
9110	<i>L. lactis</i>	nd	nd	nd	nd
1068	<i>L. lactis</i>	+	-	0	7,15
1495	<i>L. lactis</i>	nd	nd	nd	nd
8483	<i>L. lactis</i>	+	-	0	6,96
1053	<i>L. lactis</i>	+	-	0	4,73
1151	<i>L. lactis</i>	+	-	0	7,12
1594	<i>L. lactis</i>	+	-	0	7,22
9863	<i>L. lactis</i>	+	-	0	4,56
1676	<i>Lc. citreum</i>	+	-	0	6,5
UCMA	Espèce	Levée d'inhibition			
		Milieu lait chimiquement défini	Milieu fromage chimiquement défini		
1066	<i>L. lactis</i>		Acide lactique		
1067	<i>L. lactis</i>	Acide lactique			
1092	<i>L. lactis</i>		Acide lactique		
1112	<i>L. lactis</i>		Acide lactique		
1123	<i>L. lactis</i>		Vitamines		
1125	<i>L. lactis</i>		Acide lactique		
1129	<i>L. lactis</i>		Acides aminés		
1130	<i>L. lactis</i>		Acides aminés		
1131	<i>L. lactis</i>	Acide lactique	Acides aminés		
1142	<i>L. lactis</i>	Minéraux	Minéraux		
1143	<i>L. lactis</i>		Minéraux		
1148	<i>L. lactis</i>	Acide lactique	Minéraux		
1491	<i>L. lactis</i>	Vitamines			
1500	<i>L. lactis</i>		Minéraux		
1501	<i>L. lactis</i>	Minéraux			
1521	<i>L. lactis</i>	Acide lactique			
1540	<i>L. lactis</i>	Vitamines			
1546	<i>L. lactis</i>	Vitamines			
1557	<i>L. lactis</i>	Minéraux			
1596	<i>L. lactis</i>	Acide lactique			
1599	<i>L. lactis</i>		Acides aminés		
1609	<i>L. lactis</i>	Minéraux			
1655	<i>L. lactis</i>		Minéraux		
1670	<i>L. lactis</i>	Vitamines			
1684	<i>L. lactis</i>	Acide lactique	Acide lactique		
3065	<i>L. lactis</i>	Acide lactique			
1343	<i>L. laudensis</i>	Acide lactique			
1643	<i>L. chungangensis</i>		Minéraux		
11475	<i>Kluyveromyces lactis</i>		Vitamines		

A. : *Aerococcus*, *L.* : *Lactococcus*, *Lc.* : *Leuconostoc*

nd : non déterminé

+ : inhibition supérieure à 80%

- : inhibition inférieure à 80%

5. Associations des candidats bioprotecteurs sélectionnés

Suite aux résultats de corrélation entre vitesse de croissance et luminescence, les 41 isolats sélectionnés ont été testés en co-culture en milieu chimiquement défini lait non tamponné avec la souche luminescente *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} uniquement. Des tests réalisés en amont ont permis de mettre en évidence une concentration en *Salmonella* discriminante. Trois concentrations ont été testées : 10^2 , 10^4 et 10^6 UFC/mL. La concentration finale de *Salmonella* retenue et des isolats a été de 10^6 UFC/mL. Lors d'essais préliminaires la lecture d'inhibition a été définie aux temps de culture suivants : 15, 20 et 24 heures en correspondance avec la bonne corrélation vitesse de croissance et luminescence de la souche *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} sur la fenêtre de temps comprise entre 8 et 24 heures. Ces co-cultures ont été réalisées trois fois (triplicatas biologiques) et la moyenne de la luminescence calculée. Le ratio inhibiteur calculé plus haut (§ 2.2.5 p 160) a ensuite été calculé. Si ce ratio de valeurs résiduelle de luminescence était inférieur à 5% (correspondant à 95% d'inhibition), l'isolat a été considéré comme inhibiteur (+). Le tableau 56 présente les résultats obtenus. Lors de ce criblage les isolats actifs à 24 heures ont été sélectionnés pour la création d'associations. Cinq isolats issus du premier criblage et appartenant aux espèces *A. urinaeequi*, *L. lactis* et *Lc. citreum* sont retrouvés. Sur la seconde méthode de criblage neuf isolats de l'espèce *L. lactis* et un *L. laudensis* ont été retenus. Seul l'isolat UCMA 1676 a montré une inhibition avant 15 heures (inhibition à 13 heures de croissance).

Tableau 56 : Représentation de l'inhibition de la croissance de *S. Mbandaka UCMA 20269^{lux+}* en présence des isolats sélectionnés en milieu chimiquement défini lait

Isolats issus du criblage par amensalisme et/ou antibiose				
UCMA	Espèce	Temps d'incubation		
		15 h	20 h	24 h
5972	<i>A. urinaeequi</i>	-	-	+
6078	<i>A. urinaeequi</i>	-	-	-
6731	<i>A. urinaeequi</i>	-	-	-
9110	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1068	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1495	<i>L. lactis</i>	-	+	+
8483	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1053	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1151	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1594	<i>L. lactis</i>	-	-	-
9863	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1676	<i>Lc. citreum</i>	+	+	+
Isolats issus du criblage en milieu chimiquement défini liquide				
UCMA	Espèce	Temps d'incubation		
		15 h	20 h	24 h
1066	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1067	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1092	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1112	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1123	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1125	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1129	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1130	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1131	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1142	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1143	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1148	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1491	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1500	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1501	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1521	<i>L. lactis</i>	-	+	+
1540	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1546	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1557	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1596	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1599	<i>L. lactis</i>	-	-	+
1609	<i>L. lactis</i>	-	+	+
1655	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1670	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1684	<i>L. lactis</i>	-	-	+
3065	<i>L. lactis</i>	-	-	-
1343	<i>L. laudensis</i>	-	+	+
1643	<i>L. chungangensis</i>	-	-	-
11475	<i>K. lactis</i>	-	-	-

A. : *Aerococcus*, *K.* : *Kluyveromyces*, *L.* : *Lactococcus*, *Lc.* : *Leuconostoc*

5.1. Activités des associations binaires en milieu chimiquement défini lait

Les 15 isolats sélectionnés ont ensuite été testés en associations deux à deux (soit un total de 105 combinaisons), trois fois (triplicatas biologiques). La concentration finale de la souche de *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} a été ajustée à 10⁶ UFC/mL et pareillement pour les duos de chaque association. L'expérience a été réalisée trois fois au total. Afin d'obtenir les candidats les plus prometteurs mais également par d'importantes variations de résultats entre les essais, seuls les isolats présents dans les associations mettant en évidence l'inhibition la plus précoce (à 15 heures de culture) sur les trois essais ont été sélectionnés et non les associations en elle-même. Aucune inhibition n'a pu être constatée avant 15 heures de culture. Le tableau 57 représente les 10 isolats sélectionnés pour la suite ainsi que ceux non sélectionnés (actifs après 15 heures). Un seul isolat issu du criblage par amensalisme et/ou antibiose est retrouvé, l'isolat UCMA 1676 de l'espèce *Leuconostoc citreum* et neuf sont issus de la seconde méthode en milieu chimiquement défini liquide avec huit *L. lactis* et un *L. laudensis*.

Tableau 57 : Isolats testés en associations binaires

UCMA	Espèce	Temps d'incubation			Sélection
		15 h	20 h	24 h	
1676	<i>Lc. citreum</i>	+	+	+	Oui
1067	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1131	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1521	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1546	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1596	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1599	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1609	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1684	<i>L. lactis</i>	+	+	+	Oui
1343	<i>L. laudensis</i>	+	+	+	Oui
5972	<i>A. urinaeequi</i>	-	-	-	Non
1151	<i>L. lactis</i>	-	+	+	Non
1496	<i>L. lactis</i>	-	+	+	Non
9863	<i>L. lactis</i>	-	+	+	Non
1501	<i>L. lactis</i>	-	-	+	Non

5.2. Activités des associations ternaires en milieu chimiquement défini lait

Les 10 souches sélectionnées ont été testées en association par trois (120 combinaisons) à une concentration finale de 10^6 UFC/mL en co-culture avec la souche lumineuse de *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} à concentration 10^6 UFC/mL retenus. L'expérience a été réalisée trois fois (triplicatas biologiques).

La figure 45 représente l'évolution en fonction du temps de la luminescence de *Salmonella* UCMA 20269^{lux+} en co-cultures avec les différentes associations. Le nombre de combinaisons étant trop importantes, la figure représente les 16 association actives ainsi que des exemples d'associations actives plus tardivement (après 15 heures) et non actives. Parmi les 120 combinaisons, 16 ont montré une inhibition de la souche de *Salmonella* avant 13 heures d'incubation. Une inhibition à partir de 10 heures est observée pour 3 associations (14, 15 et 16) et 11h30 pour le restant.

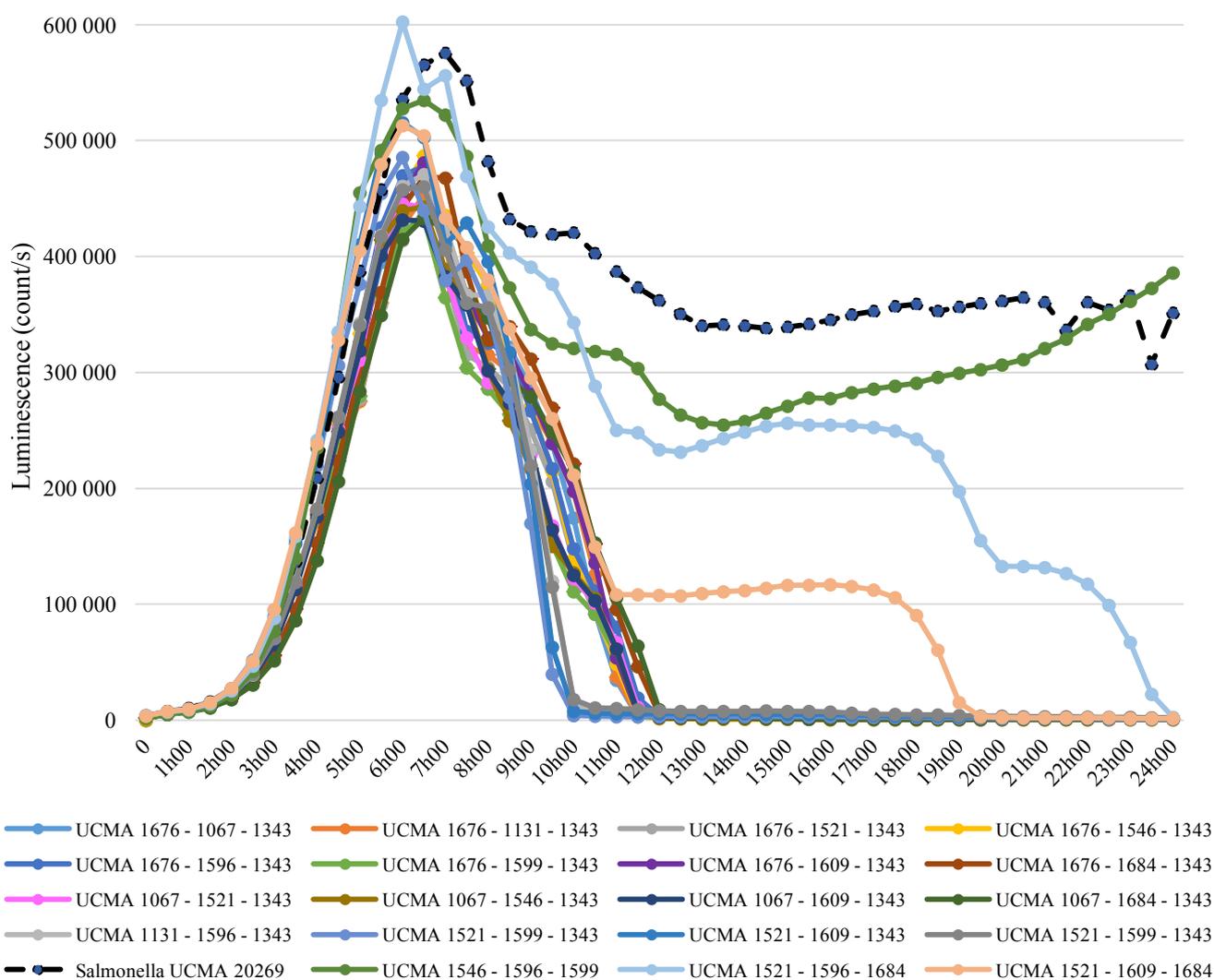


Figure 45 : Cinétique de croissance de *Salmonella* Mbandaka UCMA 20269^{lux+} en co-culture avec des associations de trois isolats en milieu chimiquement défini lait

5.3. Bilan des associations sélectionnées en milieu chimiquement défini lait

Le tableau 58 représente la moyenne du temps minimal avant l'apparition d'une inhibition. Cette valeur représente un seuil de luminescence résiduelle inférieur à 5% par rapport au témoin seul (95% d'inhibition minimum). Les valeurs sont comprises entre 9 et 10,7 heures. Dans chaque association retenue, la souche UCMA 1343 correspondant à l'espèce *Lactococcus laudensis*, est présente. La moitié des associations contiennent la souche UCMA 1676 correspondant à l'espèce *Leuconostoc citreum*. Cette dernière représente la seule souche restante issue du criblage par amensalisme et/ou antibiose en milieux opaques. Un pool de sept de ces associations fut sélectionné afin d'obtenir une diversité des souches, modes d'actions ainsi que du seuil d'inhibition minimal observé.

Tableau 58 : Sélection des associations de candidats bioprotecteurs

Association (UCMA)	Moyenne du seuil d'inhibition (heures)	Ecart-type	Association sélectionnée
1676 - 1521 - 1343	10	2	Oui
1676 - 1546 - 1343	10,3	1,5	Oui
1676 - 1599 - 1343	10	2	Oui
1676 - 1609 - 1343	10,3	2,1	Oui
1067 - 1521 - 1343	10	2	Oui
1067 - 1609 - 1343	10,3	1,5	Oui
1131 - 1596 - 1343	9,7	0,6	Oui
1676 - 1067 - 1343	10,3	1,5	Non
1676 - 1131 - 1343	10,3	2,1	Non
1676 - 1596 - 1343	10	2	Non
1676 - 1684 - 1343	10,7	1,5	Non
1067 - 1546 - 1343	10	1,7	Non
1067 - 1684 - 1343	10,3	1,5	Non
1521 - 1599 - 1343	9,3	0,6	Non
1521 - 1609 - 1343	9	0	Non
1521 - 1343 - 1343	9,7	0,6	Non
1521 - 1609 - 1684	19	2	Non
1521 - 1596 - 1599	24	1,9	Non
1546 - 1596 - 1599	Aucune inhibition	-	Non

Les 41 isolats sélectionnés après les différents tests (détection d'amine biogène, résistance aux antibiotiques...) ont été dans un premier temps (re)testés par la méthode de criblage en milieu chimiquement défini liquide lait non tamponné afin de réévaluer le potentiel inhibiteur pour les souches issues du second criblage, et d'évaluer pour la première fois le potentiel inhibiteur avec cette méthode pour les isolats issus du criblage 1. L'appareil ne permettant pas un suivi sur 24 heures dans les conditions « fromages » (15°C) les associations n'ont pu être réalisées qu'en milieu chimiquement défini lait. Les différents essais ont été réalisés trois fois chacun indépendamment et seuls les isolats présentant une inhibition dans les trois essais ont été sélectionnés à chaque étape. Ce premier essai a permis de réduire le nombre d'isolats pour la mise en place des associations. Quinze isolats ont pu être sélectionnés pour la mise en place d'associations par deux. Lors de cette étape les isolats présents dans les associations présentant l'inhibition la plus précoce ont été sélectionnés. La limite de cette méthode repose ici sur la reproductibilité des résultats obtenus en associations par deux. L'évaluation d'interactions en co-culture réalisées en microplaques a montré une variabilité importante lors des essais. C'est pour cela que seuls les isolats retrouvés dans les différentes associations inhibitrices sur les trois essais ont été sélectionnés pour la mise en place d'associations par trois.

L'objectif de la mise en place des associations par trois a été de déterminer si l'on observait un effet combiné supérieur aux effets individuels pour certaines conditions avec l'apparition d'une inhibition avant 15 heures. L'apparition d'inhibition beaucoup plus précoce a été constatée avec pour certaines associations une activité inhibitrice apparaissant dès 9 heures de culture. Les 16 isolats ayant un profil similaire en termes d'inhibition face à *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+}, l'objectif ici a été de sélectionner les associations en fonction de leur mécanisme d'action. Toutes les associations sont finalement composées de la souche UCMA 1343. Si l'on regarde cette souche seule l'inhibition n'était observée qu'à partir de 20 heures. L'activité des associations ne dépend donc pas que de cette souche bien qu'elle semble avoir un fort pouvoir inhibiteur.

5.4. Activités des associations en lait confrontées à des *Salmonella* de terrain

Le pouvoir inhibiteur des sept associations sélectionnées,ensemencées à une concentration finale de 10⁶ UFC/mL, a ensuite été testé en lait écrémé reconstitué contre cinq souches de *Salmonella* de terrain ensemencées à la même concentration. La figure 46 représente le dénombrement des différentes souches de *Salmonella* après 24 heures d'incubation à 30°C en présence des différentes associations ainsi que des souches seules comme témoins négatifs d'inhibition (UCMA 1053, 1107 et 1559).

Une bonne croissance des cinq souches de *Salmonella* testées est observée avec une concentration comprise entre $5 \cdot 10^8$ et 10^9 UFC/mL. Des concentrations similaires sont observées avec les trois témoin négatifs UCMA 1053, 1107 et 1559.

Après 24 heures de croissance, trois associations sont capables d'inhiber d'environ 1,5 log les différentes souches de *Salmonella* par rapport aux témoins : 1676-1599-1343, 1676-1609-1343 et 1067-1609-1343. Ces trois associations inhibent de la même manière les différents sérovars et souches testés. Cinq isolats sont impliqués : *Lc. citreum* UCMA 1676 (production d'acide lactique et acétique), *L. lactis* UCMA 1067 (levée d'inhibition avec les minéraux), *L. lactis* UCMA 1599 (levée d'inhibition avec les acides aminés), *L. lactis* UCMA 1609 (levée d'inhibition avec l'acide lactique), *L. laudensis* UCMA 1343 (levée d'inhibition avec l'acide lactique). Une diversité au niveau des mécanismes d'action est retrouvée, pouvant potentiellement, élargir l'activité bioprotectrice au sein du processus de transformation fromager.

L'association 1676-1599-1343 semble la plus efficace contre la souche *S. Montevideo* UCMA 19480 avec une concentration de $1,7 \cdot 10^6$ UFC/mL à 24 heures contre $3,6 \cdot 10^8$ UFC/mL pour la souche seule.

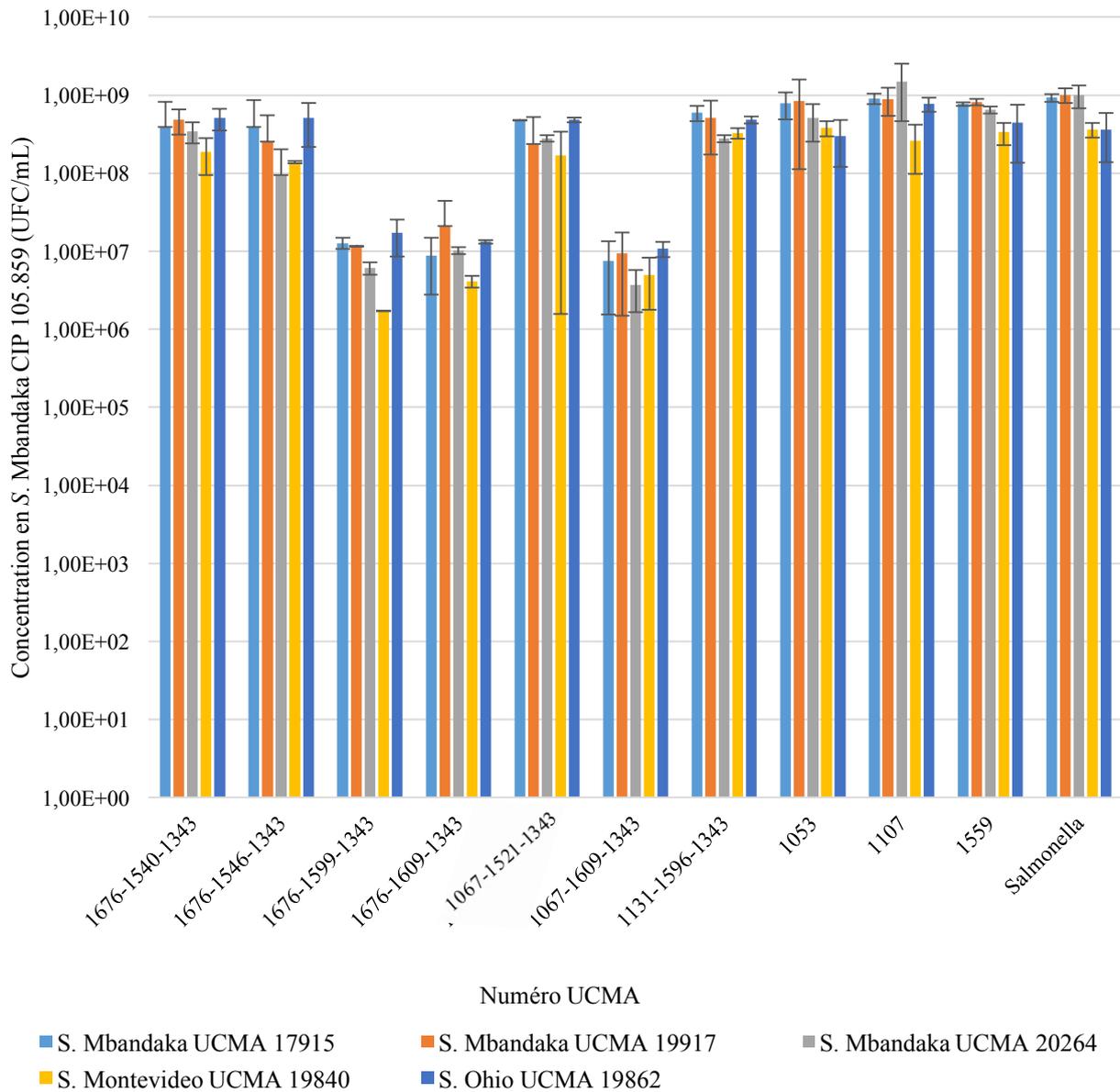


Figure 46 : Evaluation de l'inhibition des 5 souches de *Salmonella* en lait en présence des associations bioprotectrices sélectionnées

Ces trois associations ont été sélectionnées par la suite pour des validations en matrice laitière et fromagère, la fabrication de mini fromages et enfin pour les essais pilotes.

6. Impact des flores bioprotectrices sur *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 en matrice fromagère

6.1. Inoculation dans du lait

De par la difficulté de visualiser uniquement *Salmonella* en lait cru, la souche *S. Mbandaka* CIP 105.859, résistante à l'ampicilline, a été utilisée. Afin de valider l'inhibition en lait écrémé, les analyses présentées en section 5.4 ont été réalisés pour la souche *S. Mbandaka* CIP 105.859 pour les

trois associations. Les mêmes résultats ont été obtenus, à savoir une inhibition comprise entre 1,5 et 2 logs.

La figure 47 représente la concentration avant et après 24 heures d'incubation à 30°C en UFC/mL de la souche de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 en présence ou non des associations. Ici une absence d'inhibition de la croissance de *Salmonella* est observée pour toutes les conditions. En effet après 24 heures à 30°C la concentration en *Salmonella* passe de 10^3 à environ 10^6 UFC/mL. Pour la condition témoin cette valeur est plus faible avec une concentration de 10^5 UFC/mL.

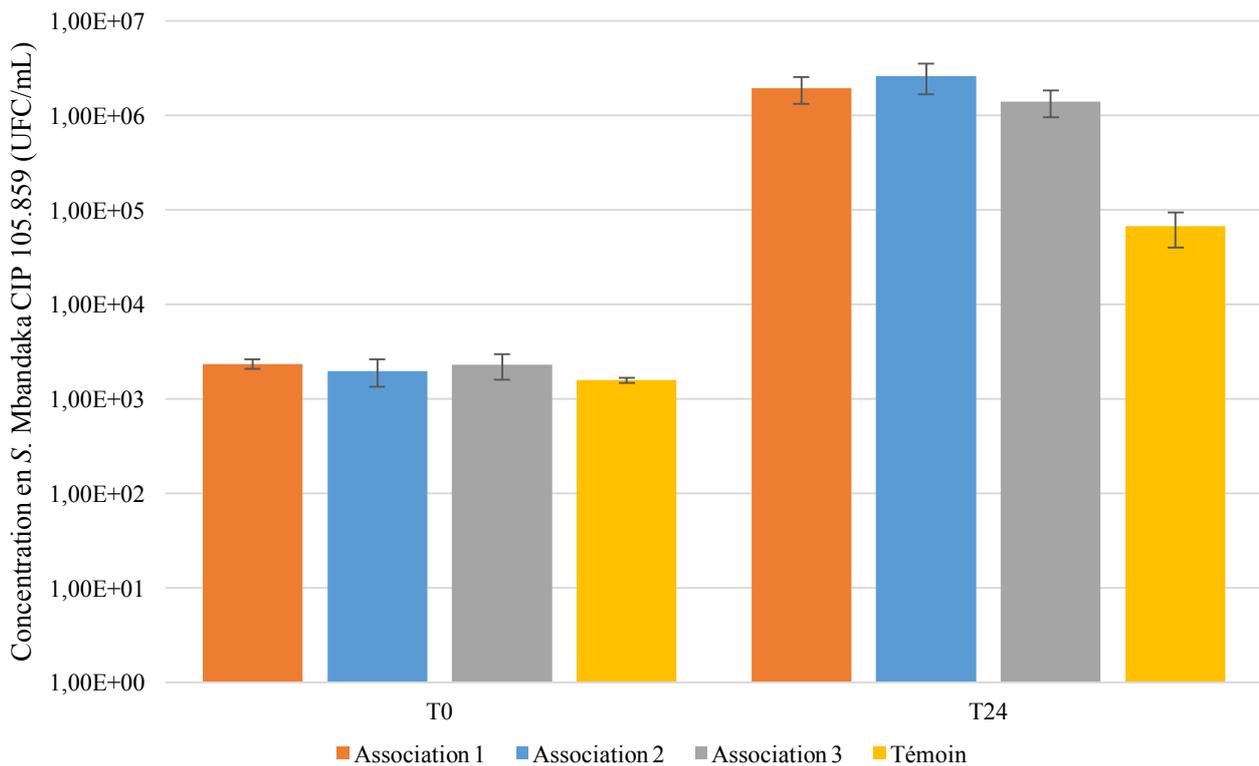


Figure 47 : Evaluation de l'inhibition de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 en lait en présence des associations bioprotectrices

Lors de l'ajout des associations bioprotectrices au contact de la souche CIP 105.859 dans le lait maturé, aucune inhibition de la croissance de *Salmonella* Mbandaka n'est observée après 24 heures de croissance. La concentration finale est identique pour les trois associations (environ 10^6 UFC/mL) et légèrement plus basse (10^5 UFC/mL) pour la condition témoin. L'une des hypothèses que le temps de contact entre les associations et *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 était trop court pour mettre en évidence une inhibition dans ces conditions. De plus, les conditions physico-chimiques ont été différentes ici avec une culture en lait maturé et non reconstitué et donc, un potentiel impact des communautés microbiennes.

6.2. Inoculation sur du caillé

Les mêmes analyses ont ensuite été effectuées sur du caillé. Pour chaque condition cinq fromages furent broyés afin d’obtenir un échantillon moyen, puis des portions de 20 g ont étéensemencées avec la solution de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 à concentration initiale de 10^3 UFC/g.

La figure 48 montre une diminution de la concentration en *Salmonella* entre le J0 et le J7 avec une concentration minimale de 10^2 UFC/g, puis une remontée à J14 à 10^3 UFC/g. Cette diminution se stabilise au J7 avec une légère baisse pour les association 1 et 3. Cependant au J14 une remontée de la concentration en *Salmonella* aux alentours de 10^3 est observée pour l’association 1 ainsi que pour le témoin. Les associations 2 et 3 restent aux alentours de 10^2 UFC/g.

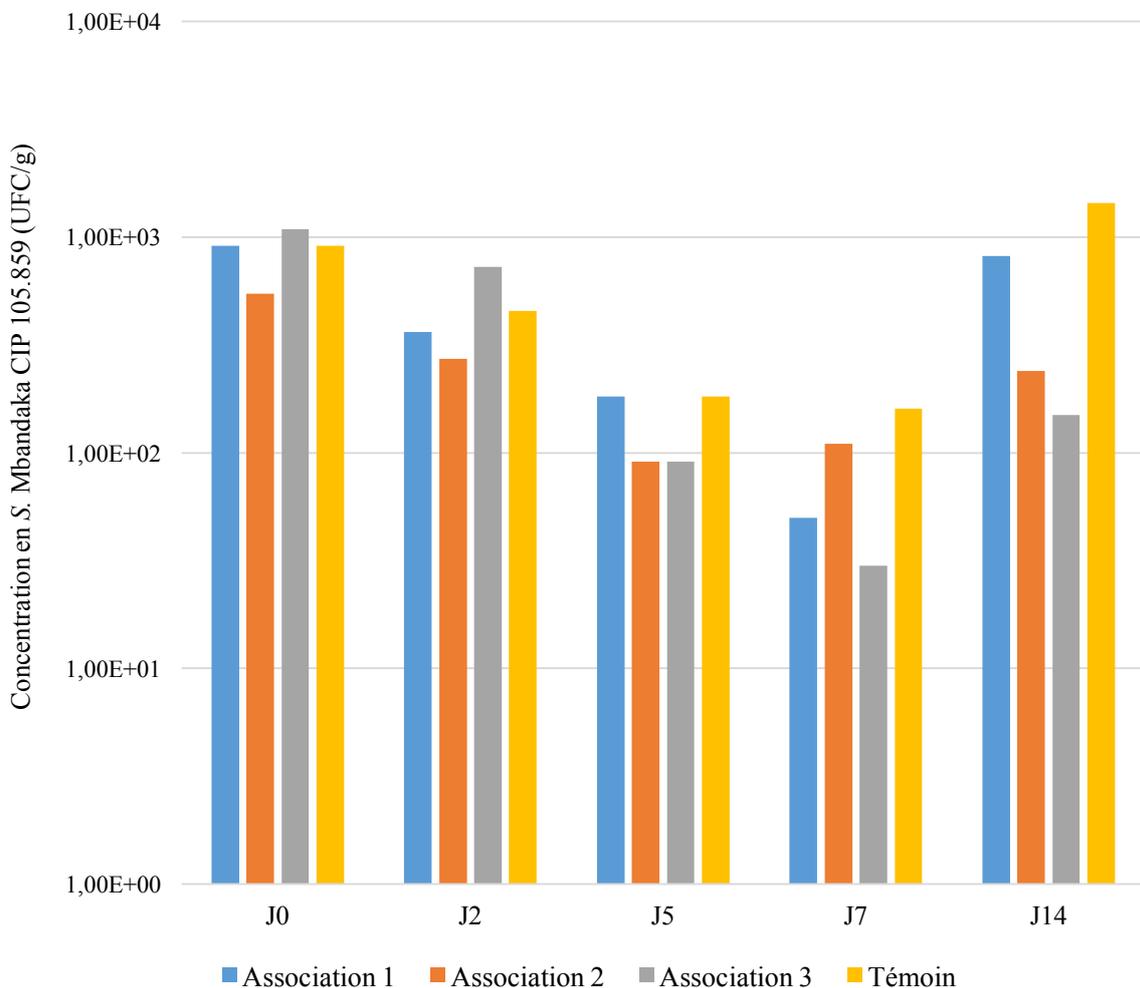


Figure 48 : Evolution de la concentration de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 sur caillé de Camembert en présence des associations bioprotectrices

Une diminution d'à peine 1 log est observée après 14 jours d'incubation pour les associations 2 et 3 par rapport au témoin. Les résultats obtenus sur caillé lors de cet essai ne permettent pas de conclure de façon certaine quant à l'inhibition de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 compte-tenu des intervalles de confiance associés à la technique de dénombrement. L'hypothèse d'un temps de contact trop court entre les isolats bioprotecteurs et *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 a conduit à envisager des essais simulant un temps plus long du process en réalisant des essais en mini-fromage.

6.3. Fabrication de mini fromages

Les tests sur lait mûré et caillé n'ayant pas mis en évidence d'inhibition une autre approche a été testée. Les associations ainsi que la souche de *Salmonella* furent directement ajoutés dans du lait de grand mélangeensemencé avec des ferments d'acidification et d'affinage, et prélevé sur site industriel juste avant maturation. Des mini fromages ont ensuite été réalisés au laboratoire à partir de ce lait. La détermination de la concentration de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 a été effectuée sur lait et caillé pendant une période de 21 jours.

La figure 49 représente la concentration de *Salmonella* retrouvée aux différents points d'analyse en fonction des associations. La charge initiale dans le lait à J0 était de 10^3 UFC/g. Vingt-quatre heures après, la charge a augmenté de 1 log pour la condition témoin sans association et légèrement pour l'association 2. La concentration en *S. Mbandaka* pour les associations 1 et 3 n'a pas évolué.

Lors de la transformation du lait en caillé, la concentration en *Salmonella* diminue et retrouve sa charge initiale aux alentours de 10^3 . La valeur pour l'association 1 est légèrement plus basse avec environ $4 \cdot 10^2$ UFC/g. A partir du J2, la concentration en *Salmonella* pour l'association 2 et pour le témoin est comprise entre 6 et $7 \cdot 10^4$ UFC/g. Cette concentration restera similaire lors des analyses aux J5, 7, 14 et 21. L'effet inhibiteur de l'association 2 n'a pas été retrouvé lors de cette transformation fromagère au laboratoire. Cependant, une inhibition de la croissance de *Salmonella* est constatée pour les associations 1 et 3 en comparaison au témoin. En effet, jusqu'au J21 la concentration est restée aux alentours de 10^3 UFC/g, soit la charge initiale inoculée dans le lait. Les concentrations les plus basses sont obtenues à l'aide de l'association 1 avec la concentration la plus basse à J5, $9 \cdot 10^1$ UFC/g. Cependant l'expérience n'ayant été effectuée qu'une fois, ces observations restent à confirmer lors d'autres essais prévus dans le cadre du projet CESam.

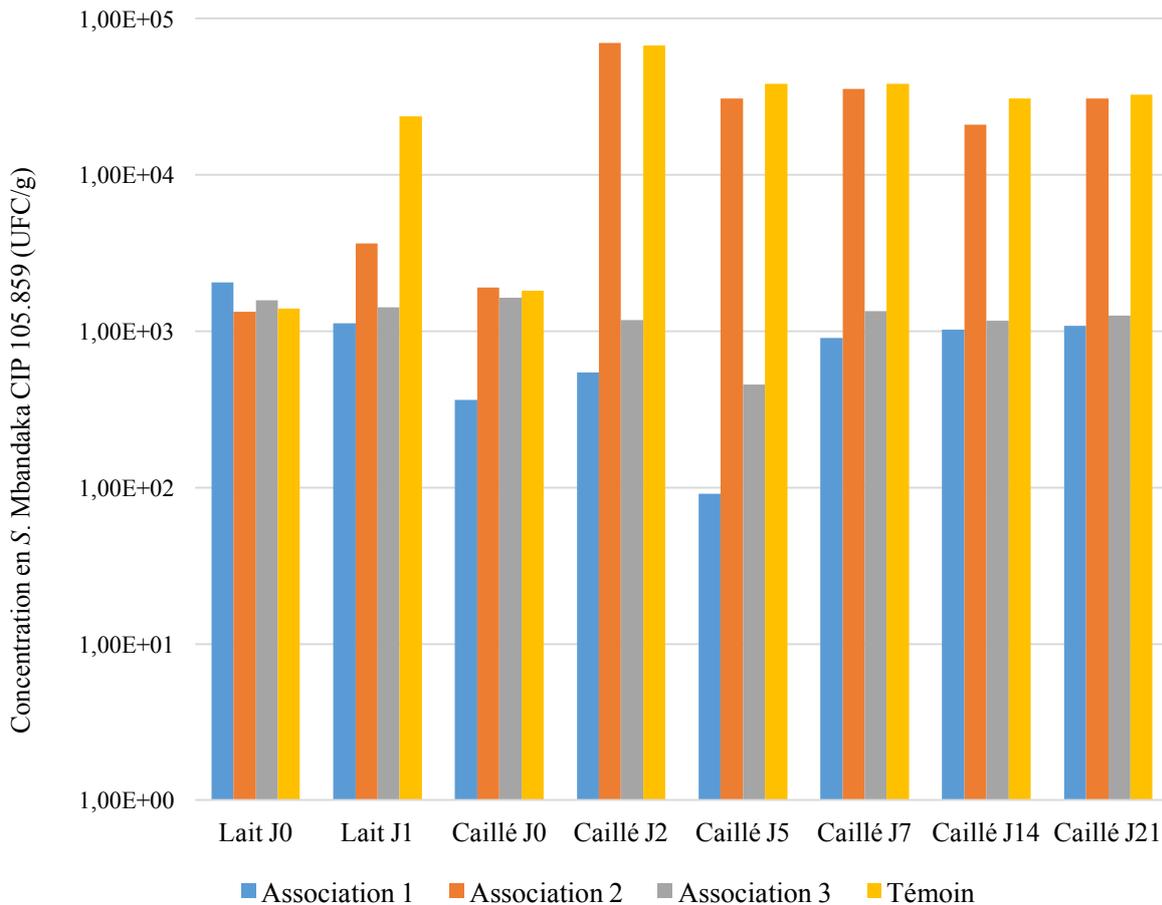


Figure 49 : Evaluation de l’inhibition de *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 lors de fabrications de mini fromages en présence des associations bioprotectrices

Lors de la fabrication des mini fromages l’activité inhibitrice de deux associations (1 et 3) a pu être mise en évidence. Afin de permettre aux associations de s’implanter correctement dans la matrice celles-ci ont été ajoutées directement dans du lait en début de maturation, juste après l’ajout des ferments. La souche *S. Mbandaka* CIP 105.859 a également été ajoutée au même moment. Cela a permis de confirmer l’hypothèse d’un ajout trop tardif des associations bioprotectrices en fin de maturation lors des précédentes expériences.

La fabrication de fromages à partir d’une matrice laitensemencée en *Salmonella* a permis de suivre l’évolution de la concentration directement pendant le processus de transformation en lui-même. On observe une adaptation et une reprise de la croissance de *Salmonella* après deux jours pour l’association le témoin confirmant les études mettant en évidence une bonne adaptation de *Salmonella* en matrice fromagère (D’aoust et al., 1985; Modi et al., 2001). Cependant on conserve la concentration initiale pour les associations 1 et 3 et ce pendant tout le processus de transformation du lait au fromage jusqu’au J21.

7. Impact sur la fabrication du Camembert au lait cru mécanisé

7.1. Impact sur les caractéristiques physico-chimiques : pH, extrait sec et protéolyse

L'évolution du pH au cours de la fabrication et de l'affinage est représentée dans la figure 50. Cette évolution est similaire entre le témoin et les différentes associations. Le pH du lait, proche de 6,5 au moment de l'emprésurage diminue rapidement sous l'action des bactéries lactiques. Au stade caillé (J2), il se situe aux alentours de 5 et ce jusqu'au J7. Cette baisse du pH favorisera l'implantation de la flore fongique qui va remonter ensuite le pH. En effet, à partir du J21 le pH remonte à 6, puis à 7 au J35 et enfin 7,5 à J65, permettant l'implantation des bactéries d'affinage.

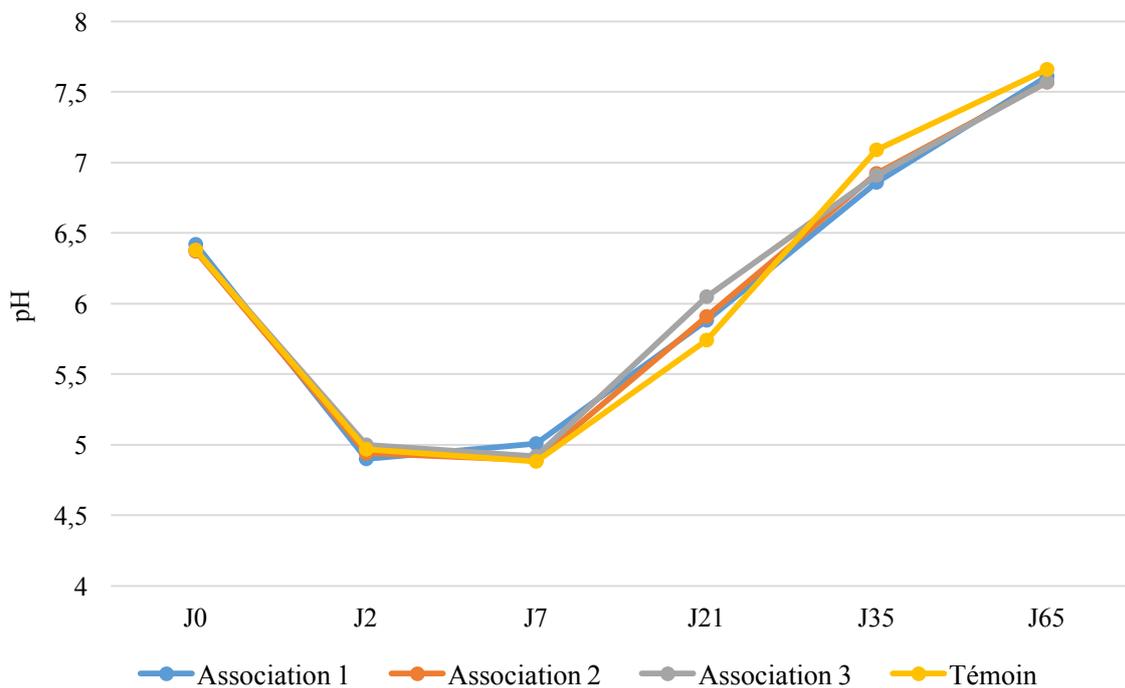


Figure 50 : Représentation de l'évolution du pH au cours de la transformation fromagère

Le tableau 59 ci-dessous représente les valeurs de l'extrait sec obtenues à partir des différents fromages. Les résultats obtenus montrent des valeurs cohérentes pour la technologie même si quelques écarts peuvent être observés par rapport au témoin, aucune tendance ne ressort clairement.

Tableau 59 : Représentation de l'évolution de l'extrait sec (%) au cours de l'affinage

Analyses	Extrait sec (%)			
	Association 1	Association 2	Association 3	Témoin
J0	X	X	X	X
J2	44,93	44,31	45,79	44,57
J7	46,29	44,52	46,55	45,64
J21	45,88	46,29	44,15	48,56
J35	43,2	47,01	46,23	45,86
J65	47,33	45,44	42,99	47,46

Le tableau 60 représente l'évolution de la protéolyse via le rapport entre la teneur en matière azotée non protéique et la teneur en matière azotée totale. Malgré quelques écarts ponctuels, la protéolyse s'est globalement bien déroulée dans les différents essais, avec cependant une valeur semblant aberrante à J35 pour l'association 1.

Tableau 60 : Représentation de l'évolution de la protéolyse au cours de l'affinage

Association	Rapport azote non protéique sur azote total			
	Association 1	Association 2	Association 3	Témoin
J2	0,05	0,04	0,05	0,07
J7	0,12	0,07	0,16	0,12
J21	0,13	0,14	0,14	0,13
J35	0,08	0,14	0,15	0,15
J65	0,20	0,25	0,23	0,24

L'acidification s'est déroulée de la même manière pour toutes les conditions et les valeurs d'extrait sec sont similaires. On a donc le même pourcentage de matières solides après déshydratation complète (protéines, lipides et sels minéraux). L'évolution de la protéolyse est similaire au cours de l'affinage pour toutes les conditions (association et témoin).

7.2. Impact sur les différentes flores

7.2.1. Suivi des bactéries à Gram négatif

La figure 51 ci-dessous montre l'évolution des bactéries à Gram négatif. Pour cette condition seulement, les analyses ont été effectuées sur fromages ayant préalablement été congelés. L'analyse des bactéries à J0 (lait) n'a pas pu être réalisée. Cependant une seconde série de fabrications a montré

des concentrations similaires entre le J0 et le J2 pour toutes les conditions. La concentration des bactéries à Gram négatif est similaire pour toutes les conditions. La charge initiale se situe aux alentours de 3.10^5 UFC/g à J2. Elle augmente de deux logs à J21 et se stabilise aux alentours de 10^8 UFC/g aux J35 et J65.

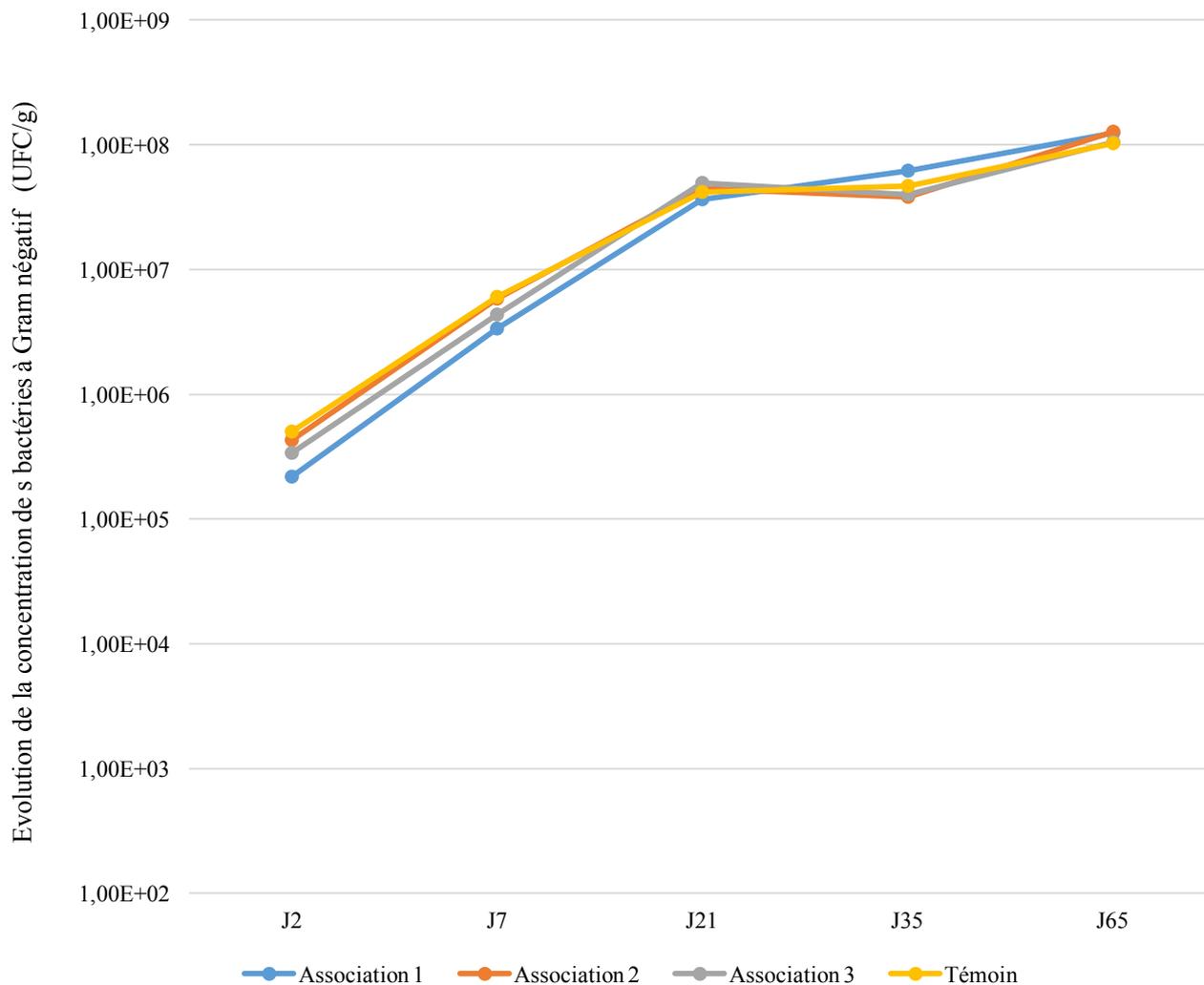


Figure 51 : Représentation de l'évolution des bactéries à Gram négatif au cours du processus de transformation fromagère

7.2.2. Suivi des bactéries lactiques

La figure 52 représente l'évolution des bactéries lactiques. En corrélation avec les résultats du pH, une augmentation de 2 log de la concentration des bactéries lactiques est observée à partir du deuxième jour atteignant environ 5.10^8 UFC/g. Une diminution est ensuite observée à partir du 21^{ème} jour et la concentration restera aux alentours de 10^8 - 10^7 UFC/g jusqu'en fin d'affinage.

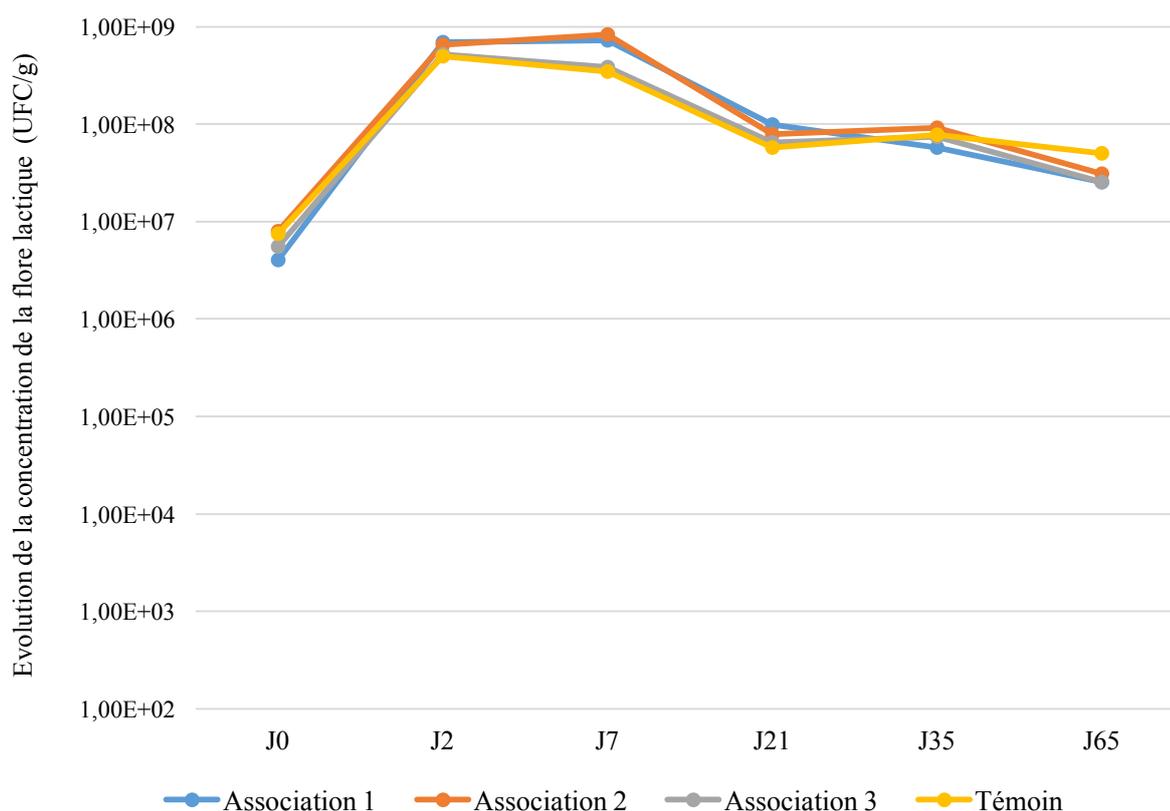


Figure 52 : Représentation de l'évolution des bactéries lactiques au cours du processus de transformation fromagère

D'une manière générale, les profils des fromages avec les associations bioprotectrices sont similaires à ceux du témoin. Dans son étude, Lenoir observait une concentration constante de 10^9 UFC/g pour le genre *Lactococcus* et 10^7 UFC/g pour le genre *Lactobacillus* à 30 jours d'affinage. Dans une autre étude (Mallet, 2012), la concentration en *Lactobacillus* à 50 jours d'affinage se situait aux alentours de 10^8 UFC/g. Ici, la concentration en bactéries lactiques au J35 et J65 a légèrement diminué par rapport au J2 mais l'on conserve une concentration importante se situant aux alentours de 10^8 UFC/g sont en accord avec la littérature.

7.2.3. Suivi de la flore fongique

La figure 53 représente l'évolution de la flore fongique au cours du temps. En corrélation avec la baisse du pH effectuée par les bactéries lactiques, la concentration de cette flore a augmenté de 3 logs à J7. La flore fongique de l'association 1 est légèrement plus importante que celle des autres associations et du témoin (+ 0.5 log). La concentration de cette flore a continué d'augmenter pour atteindre environ 4.10^7 UFC/g en fin d'affinage.

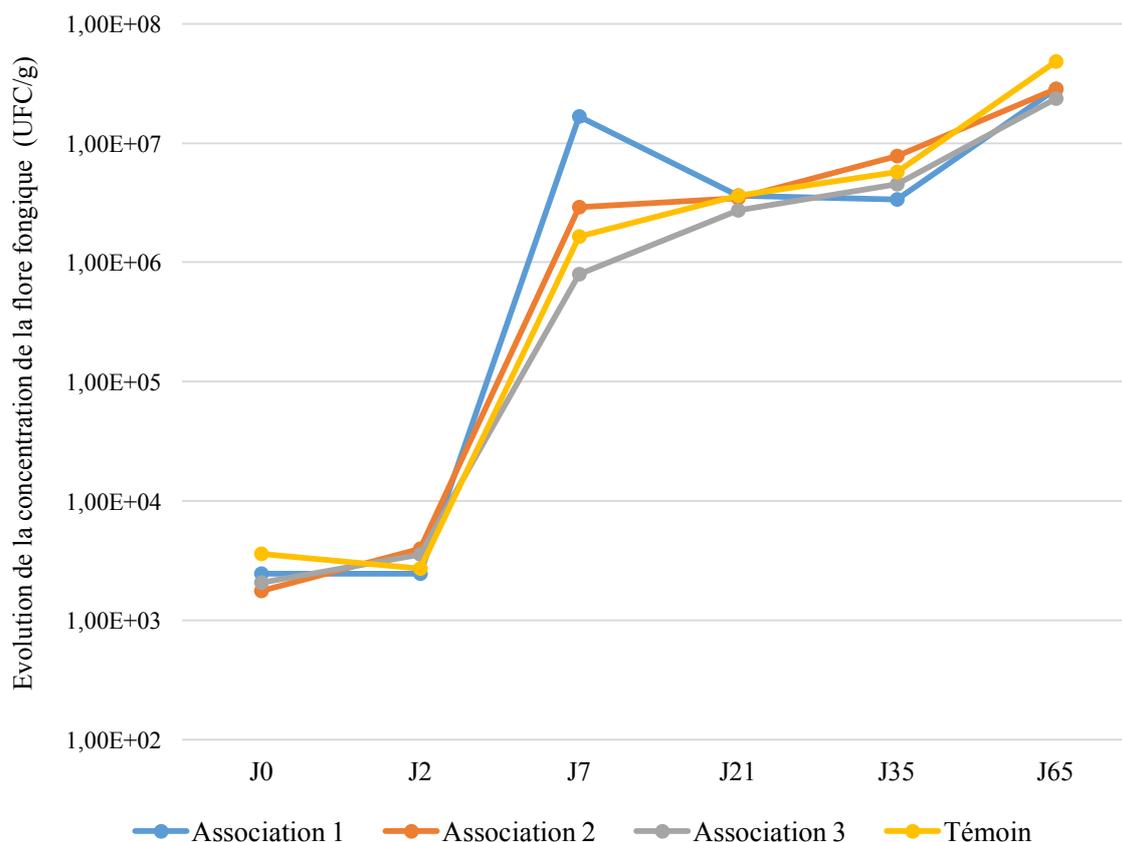


Figure 53 : Représentation de l'évolution de la flore fongique au cours du processus de transformation fromagère

Les résultats obtenus pour le dénombrement de la flore fongique sont en accord avec littérature. En effet, dans son étude sur l'évolution de cette flore dans le camembert de Normandie, Lenoir observait une concentration de $5 \cdot 10^6$ UFC/g dès le 4^{ème} jour de fabrication à la surface du fromage, et $5 \cdot 10^5$ UFC/g au cœur du fromage au 7^{ème} jour (Lenoir, 1963). Dans notre étude, une concentration aux alentours de $3 \cdot 10^6$ UFC/g au 7^{ème} jour de fabrication a été relevée. Ces concentrations sont également en accord avec les résultats obtenus dans d'autres travaux avec des valeurs comprises entre 10^3 et 10^4 UFC/g à J1 et aux alentours de 10^7 UFC/g aux J36 et 37 (Desmasures, 1995).

7.2.4. Suivi des bactéries d'affinage

L'évolution des bactéries d'affinage est représentée sur la figure 54 ci-dessous. Certaines valeurs à certains stades sont différentes en fonction des associations, cependant l'évolution globale reste la même. L'augmentation de la concentration de cette flore n'intervient que lorsque le pH lui est favorable, et devient visible au J35. Elle passera d'environ $5 \cdot 10^5$ UFC/g à 10^7 UFC/g à J35 et enfin

4.10^7 UFC/g à J65. La concentration en bactéries d'affinage est un peu plus importante dans la condition témoin entre J2 et J35. A J7, jusqu'à un log de plus est relevé pour l'association 1 par rapport aux autres conditions.

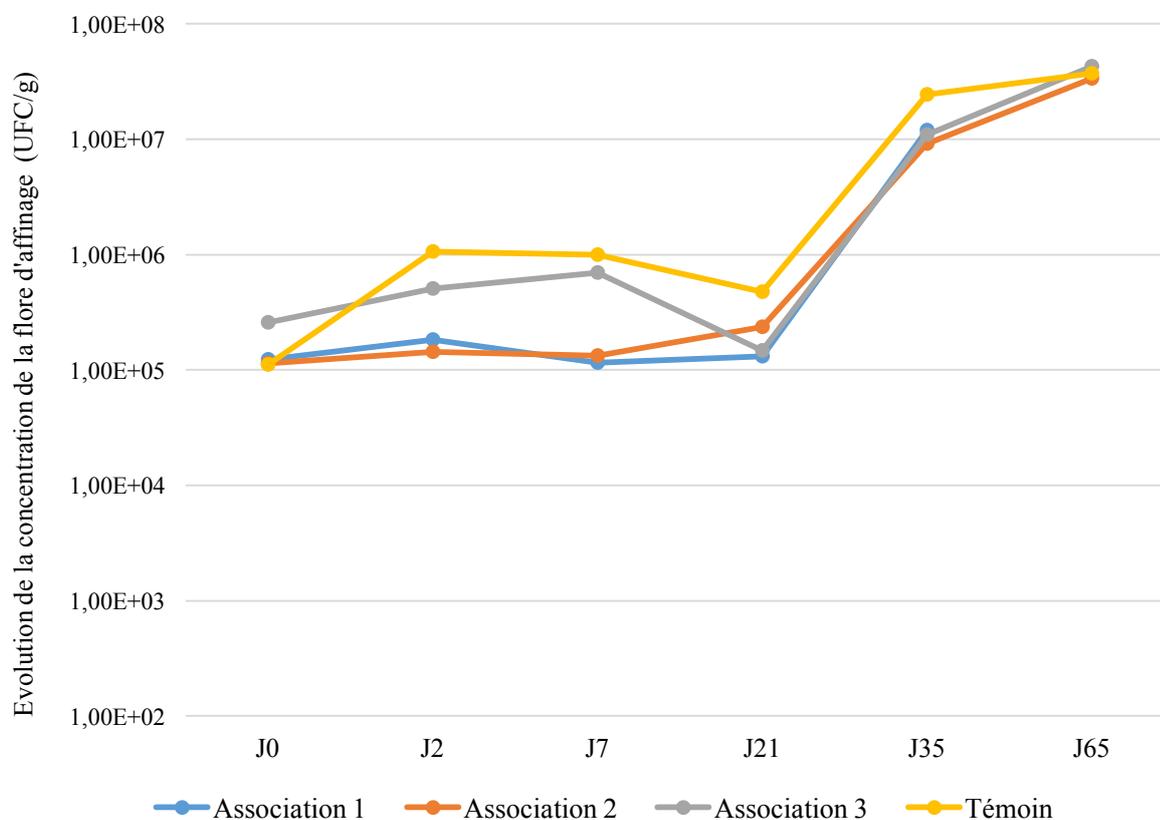


Figure 54 : Représentation de l'évolution des bactéries d'affinage au cours du processus de transformation fromagère

Les concentrations étaient comprises entre 10^5 et 10^6 UFC/g jusqu'au J21 puis, aux J35 et J65, une concentration aux alentours de 10^7 UFC/g. Les concentrations étaient plus importantes (de presque 1 log) du J2 au J7 inclus pour l'association 3 ainsi que le témoin.

7.2.5. Impact sur les qualités organoleptiques

Les critères évalués lors des deux dégustations ont été : l'affinage, l'aspect, la texture, le persillage et le goût. Les résultats des analyses sensorielles sont répertoriés dans le tableau 61. Après 35 jours, le niveau d'affinage semblait un peu plus avancé pour les fromages en présence des associations 2 et 3. Pour l'association 1 et le témoin l'affinage était conforme. Tous les fromages avaient un bel aspect et une bonne texture, cependant le fromage avec l'association 3 paraissait légèrement collant. L'apparition du persillage était plus prononcée pour l'association 2. Au niveau

du goût c'était encore une fois l'association 2 qui sortait du lot, suivie des associations 1 et 3, puis du témoin au goût caractérisé de « fade ».

Après 65 jours d'affinage, l'apparition du ferment du rouge était bien observée pour tous les fromages. La texture était conforme pour tous, cependant au niveau du goût, l'association 2 ressortait ici de manière négative avec un goût trop prononcé voire désagréable.

Tableau 61 : Analyse sensorielle des fromages en présence ou non des associations après 35 et 65 jours d'affinage

J35				
Suivi	Association 1	Association 2	Association 3	Témoin
Affinage	Conforme	Un peu avancé	Un peu avancé	Conforme
Aspect	Bel aspect	Bel aspect	Bel aspect	Bel aspect
Texture	Bonne texture	Bonne texture	Un peu trop collant	Bonne texture
Persillage	Légèrement présent	Présence de persillage	Légèrement présent	Légèrement présent
Goût	Bon goût	Très bon goût	Bon goût	Fade
J65				
Suivi	Association 1	Association 2	Association 3	Témoin
Aspect	Présence de points rouges (ferments du rouge)			
Texture	Bonne texture	Bonne texture	Bonne texture	Bonne texture
Goût	Typé, correct	typé très fort, désagréable	typé, agréable	typé doux, agréable

Les associations sembleraient donc impacter dans certains cas les caractéristiques des produits. D'une manière générale c'est l'association 2 qui semble avoir le plus d'impact sur les qualités organoleptiques du fromage avec notamment un impact négatif à J65. Un stade d'affinage plus avancé a été relevé au J35. Cela pourrait être dû aux interactions de la combinaison des trois isolats. En effet, si l'on regarde la composition de l'association 2 on y retrouve l'isolat UCMA 1676, *Lc citreum*, également présent dans l'association 1 mais n'impactant pas le niveau d'affinage ou le goût. L'isolat UCMA 1609, *L. lactis*, présent dans l'association 3 et l'isolat UCMA 1343, *L.*

laudensis, présent dans toutes les associations, sont retrouvés. L'hypothèse pouvant être émise ici est que ce sont les interactions entre les trois isolats qui ont un impact sur cette technologie et non les isolats en eux-mêmes. En effet, les autres associations n'ont pas d'impact négatif sur le développement du fromage ni son goût. Les associations 1 et 3 au J65 sont elles très proches du témoin. Ces résultats seront à confirmer lors d'un second essai pilote réalisé également en Camembert au lait cru mécanisé, en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit.

DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE III : Discussion générale

Développement de nouvelles méthodes de criblage

Les activités de bioprotection des matrices alimentaires par des microorganismes peuvent se faire par différents mécanismes, parfois synergiques, tels que l'antibiose, l'amensalisme ou encore la compétition nutritionnelle.

Dans le cadre de cette étude sur le développement de cultures par la bioprotection du Camembert de Normandie, plusieurs défis devaient être relevés pour la recherche de candidats bioprotecteurs :

- Mettre en évidence une action bioprotectrice par différents mécanismes d'action
- Cribler un grand nombre d'isolats en simultané
- Utiliser différents milieux potentiellement opaques pour se rapprocher des différentes étapes du processus de fabrication du fromage.

Egalement, dans le but de développer un outil utile pour toutes les filières utilisant la bioprotection, il fallait que ces méthodes puissent être adaptées à d'autres pathogènes et/ou d'autres matrices. Deux méthodes de criblage ont ainsi été mises au point : une première mettant en évidence une action par amensalisme et/ou antibiose et une seconde mettant en évidence une action de type interaction nutritionnelle.

La première méthode repose sur la production de molécules telles que les bactériocines, les biosurfactants, les acides organiques... Il n'existe à l'heure actuelle à notre connaissance aucune méthodologie de criblage rapide utilisant des milieux gélosés opaques. L'approche a été de miniaturiser la méthodologie classique du « spot agar assay » sur microplaques 96 puits et d'utiliser les milieux opaques (lait et fromage). Dans notre cas, l'utilisation des deux milieux et de températures d'incubation adéquates permettait de sélectionner des micro-organismes potentiellement actifs durant une ou deux étapes du processus de transformation de fromage associées : étape de début de maturation secondaire du lait et d'affinage du fromage. L'utilisation de milieux opaques ne permettant pas une lecture de l'inhibition par la présence d'un halo d'inhibition, la lecture s'est donc effectuée avec l'utilisation d'un composé redox coloré, la résazurine, largement utilisé dans des études pour la mise en évidence d'inhibition cellulaire ou encore bactérienne en milieu liquide. Cette méthode, grâce à l'utilisation d'un replicateur, permet la transposition de cultures réalisées en Deepwell® sur un grand nombre de microplaques et donc le criblage dans des conditions

physicochimiques variées. Elle pourrait potentiellement être utilisée contre d'autres pathogènes d'intérêt susceptibles d'être rencontrés et dans d'autres fromages AOP de Normandie. Au-delà de la matrice laitière elle pourrait également être transposée à d'autres matrices pour lesquelles la bioprotection est envisagée.

Dans le cadre de notre étude 1 450 isolats issus de l'environnement laitier ont été criblés. Parmi ces isolats, de nombreuses bactéries lactiques sont retrouvées mais aussi d'autres genres tels que *Pseudomonas* ou encore *Arthrobacter*. Un des objectifs de cette étude était également d'investiguer de nouveaux genres bactériens à activité anti-*Salmonella* et potentiellement utilisables en industrie agroalimentaire. En effet, certains micro-organismes actifs ne sont pas considérés à l'heure actuelle comme étant d'intérêt technologique (exemple : *Raoutella*), mais sont présents dans certains fromages. Il serait intéressant d'évaluer de manière plus approfondie leur intérêt dans la technologie fromagère.

Sur tous les isolats, 447 ont montré une activité inhibitrice sur l'un des trois milieux testés (BHI, lait et fromage) contre au moins une des trois souches de *Salmonella* testées. On a pu retrouver une forte activité inhibitrice du genre *Lactococcus* avec 219 isolats actifs soit 70% par rapport au nombre d'isolats de ce genre testés. Ceci pourrait être lié à sa grande proportion dans le criblage, mais également de par son fort potentiel inhibiteur bien décrit dans la littérature (Carr et al., 2002). L'autre genre ressortant le plus était *Aerococcus*. En effet, sur les 31 isolats testés 29 ont eu une activité inhibitrice dans au moins une des conditions testées. S'il fait également partie de la famille des bactéries lactiques ce genre n'est que peu étudié pour son potentiel en tant qu'agent bioprotecteur. De manière intéressante, ce sont sur les milieux « lait » et « fromages » gélosés que l'on retrouve la plus forte activité anti-*Salmonella* avec le double d'isolats inhibiteurs par rapport au milieu classique BHI. Cette constatation peut être mise en corrélation avec la prédominance des bactéries lactiques, très présentes en matrice laitière et fromagère et donc bien adaptées à ces matrices. En effet si l'on compare le nombre d'isolats du genre *Lactococcus* actifs en milieu BHI par rapport aux milieux lait et fromage, deux fois plus d'isolats actifs sont détectés dans les matrices laitières. L'utilisation de milieux lait et fromage a permis de confirmer l'importance de l'utilisation de milieux de culture proches de la matrice pour la mise en évidence d'inhibition. En effet, si le criblage n'avait été effectué que dans des conditions classiques nous n'aurions pu mettre en évidence que la moitié des isolats qui n'auraient été que potentiellement inhibiteurs en matrice réelle.

Si cette méthode possède de nombreux avantages (conditions proches de la matrice, criblage rapide de nombreux isolats), elle ne permet qu'une détection qualitative de l'inhibition mais pas une quelconque quantification et comparaison de l'inhibition. En effet sur les méthodes classiques de « spot agar assay » le diamètre de l'inhibition peut être mesuré et les effets antagonistes des isolats peuvent être comparés entre eux. Un autre paramètre à prendre en compte sur cette méthodologie est l'absence de standardisation des cultures utilisées. En effet les isolats ont été testés à partir d'une culture de 24 heures sans calculer la concentration cellulaire finale, toujours dans un objectif de criblage rapide.

La mise en évidence des molécules potentiellement produites par les isolats sélectionnés sur la première méthode de criblage a été effectuée par l'analyse des surnageants en microplaques et par HPLC. L'analyse des surnageants en milieu synthétique lait issus, pour la plupart, de bactéries lactiques, met en évidence une activité inhibitrice majoritairement reliée à la production d'acides organiques. Cette constatation est en accord avec la littérature mettant en évidence la production de nombreux acides par cette famille de bactéries (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010). L'activité inhibitrice des surnageants n'a pas été retrouvée lors des différents traitements du surnageants excepté pour les quatre isolats de l'espèce *Aerococcus urinaeequi*. En effet, la conservation de l'inhibition contre la souche *S. Mbandaka* CIP 105.851 est observée lors du la neutralisation du surnageant et lors du traitement à la pronase suggérant la production de peroxyde d'hydrogène. Cette production a été confirmée par l'utilisation de bandelettes permettant de visualiser de manière approximative la quantité produite. Tous les isolats du genre *Aerococcus* ont montré une production comprise entre 30 et 100 mg/L. Comme évoqué dans le partie « résultats et discussion » la capacité de production de peroxyde d'hydrogène par ce genre a déjà été mise en évidence par deux voies de synthèse (Yanze Kontchou and Blondeau, 1990; Streitenberger et al., 2001). Le genre *Aerococcus* semble se démarquer ici par un mécanisme d'action différent de celui des autres isolats basés lui, sur la production d'acides organiques.

Cependant il est important de noter que l'analyse des molécules produites par les isolats sélectionnés sur la première méthodologie de criblage a été effectuée dans un milieu chimiquement défini différent des milieux gélosés utilisés lors du criblage. Les molécules synthétisées dans ces conditions ne seront possiblement pas les mêmes que celles mises en évidence par le criblage ou bien les concentrations pourraient être différentes. Il n'était cependant pas possible d'utiliser un milieu opaque tel que le lait ou une suspension de fromage pour la mise en évidence des molécules produites. En effet, les tests d'inhibition réalisés en microplaque par lecture de la DO ne pouvaient être

effectuées dans de tels conditions. L'identification des molécules produites lors de la présence d'une inhibition par cette méthode ont donc été effectuée dans le milieu liquide chimiquement défini. Ce changement de milieu a aussi eu un impact sur la croissance des micro-organismes. En effet, l'analyse des surnageants en milieu synthétique fromage n'a donné aucune information de part une croissance trop faible voire nulle des isolats.

L'analyse HPLC des surnageants a permis de confirmer la production d'acides organiques et de quantifier les concentrations des acides lactique et acétique. L'acide synthétisé en plus grande concentration est l'acide lactique, avec des taux très élevés pour le genre *Lactococcus* allant jusqu'à 7,22 g/L. La production d'acide succinique par *Raoultella* a également pu être mise en évidence. Malgré un nombreux important d'acides organiques testés, la molécule émise à 9,1 min n'est pas encore identifiée à l'heure actuelle. Cette indention reste importante et permettrait de mettre en évidence le mécanisme d'action différent du genre *Aerococcus* par rapport aux autres genres bactériens de la famille des bactéries lactiques issues de ce criblage. D'autres composés inhibiteurs pourraient également être mis en évidence tels que les composés volatils. Il pourrait donc être intéressant d'effectuer une analyse GC/MS afin de mettre potentiellement en évidence d'autres composés impliqués dans l'inhibition à *Salmonella*.

Si la mise en évidence d'une inhibition par production de molécules est bien décrite, la mise en évidence d'une compétition nutritionnelle reste plus difficile. En effet, si plusieurs études ont déjà mis en évidence cette compétition, il n'existe pour le moment pas de méthodologie standardisée permettant un criblage par ce mécanisme d'action. Afin de mettre en place une méthodologie pouvant mettre en évidence une potentielle compétition nutritionnelle il a fallu dans un premier temps répondre au questionnement suivant : Quels pourraient être les nutriments et/ou facteurs de croissance de *Salmonella* en concentration limitante dans les matrices laitière et fromagère pouvant être mis en jeu dans un contexte de compétition nutritionnelle ?

Peu d'informations étant disponibles sur les besoins réels en oligo-éléments et autres composés pour *Salmonella*, deux approches ont été utilisées : une première approche permettant de mettre en évidence l'utilisation de différentes sources de carbones, et une analyse exploratoire du captage des oligo-éléments présents dans le lait. Ces deux approches ont montré que le genre *Salmonella* était capable de croître grâce à de nombreuses sources de carbone et de consommer de

nombreux oligo-éléments présents dans le lait. Ces observations confirment celles de la bibliographie selon laquelle *Salmonella* est tout à fait capable de survivre et de croître dans la matrice laitière. Grâce à cette analyse nous avons pu adapter deux milieux de culture chimiquement définis lait et fromage pour la mise en évidence de la compétition nutritionnelle. L'utilisation de deux souches, *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+} et *S. Typhimurium* UCMA20268^{lux+}, comme marqueurs de l'activité métabolique a été validée. Cependant on a pu constater une faible corrélation de la vitesse de croissance par rapport à la luminescence notamment pour la souche UCMA 20268^{lux+} avec une fenêtre de corrélation comprise entre 2 et 7,5 heures uniquement. Pour la souche *S. Mbandaka* UCMA 20269^{lux+} la fenêtre était plus importante avec une bonne corrélation entre 8 et 24 heures. Bien qu'il n'y ait pas toujours de corrélation positive entre la croissance et la luminescence, la méthode reste cependant valable pour évaluer une chute de l'activité métabolique. A partir de ces résultats nous avons pu proposer un calcul permettant de déterminer la présence d'une inhibition de *Salmonella* en co-culture. Ce calcul reflète la réduction de l'activité métabolique, et ce dans une fenêtre permettant aussi de corrélérer la réduction de la luminescence à une réduction de la croissance.

Afin d'éliminer les isolats potentiellement producteurs de composés, le criblage a été réalisé sur les isolats non actifs sur la première méthodologie de criblage et dans un milieu tamponné afin d'éviter un mécanisme par effet pH. Cependant, le criblage n'était pas réalisé dans les mêmes milieux, de par l'impossibilité d'utiliser des milieux liquides opaques. Il n'est donc pas exclu que les isolats non producteurs de composés sur la méthode 1 le soient dans les conditions de la seconde méthode. Il aurait pu être intéressant de réaliser le criblage 1 dans une version gélosée du milieu chimiquement défini afin de pouvoir comparer les résultats obtenus et de confirmer l'absence de production de composés. Sur les 414 isolats criblés, 138 ont été actifs dans au moins une des conditions testées. La grande majorité des isolats actifs testés appartenaient au genre *Lactococcus* avec presque la moitié des isolats criblés actifs. De manière intéressante, malgré un fort pourcentage d'isolats du genre *Lactobacillus* criblés, très peu sont actifs. Cela est majoritairement dû aux conditions de criblage non favorables à leur croissance. L'utilisation d'un milieu chimiquement défini bien particulier n'est pas toujours optimal voire suffisant pour la croissance de certains micro-organismes. En effet, même si ce milieu permet de mimer la composition du lait et du fromage, il n'est pas composé exactement de la même manière et donc ne permet pas la croissance de tous les genres capables de croître en matrice laitière et fromagère. Il aurait pu être intéressant de s'orienter vers un ultrafiltrat de lait en tant que milieu « lait » et de mettre au point un système de filtration identique pour obtenir un ultrafiltrat à partir d'une suspension de fromage.

Contrairement au premier criblage, une différence a été observée quant au nombre d'isolats actifs, avec une inhibition plus importante en milieu synthétique lait avec 138 isolats contre 80 en milieu fromage. Cette différence d'inhibition pourrait être expliquée en partie par des conditions d'incubation non optimales en milieu synthétique fromage avec une température d'incubation des isolats de 15°C contre 30°C en milieu synthétique lait, le tout dans un milieu synthétique où la croissance de certains genres était plus faible. La majorité des isolats actifs sur cette méthode appartiennent au genre *Lactococcus*.

Les isolats issus de cette méthode de criblage ont été testés pour la mise en évidence d'une levée d'inhibition en supplémentant le milieu chimiquement défini. D'après les résultats obtenus par l'analyse en ICP-MS, les résultats de la plaque BIOLOG GEN III et la bibliographie, les minéraux, les vitamines et les acides aminés pourraient être des facteurs de compétition nutritionnelle et sont présents à de faibles concentrations dans la matrice laitière. De par les résultats intéressants obtenus sur plaque GEN III quant à l'acide lactique, cet élément a également été testé dans la mise en évidence d'une levée d'inhibition. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner des isolats pour lesquels une levée d'inhibition de *Salmonella* a été observée sur l'un des éléments ciblés à des concentrations deux fois plus importantes. D'une manière générale, une levée d'inhibition est constatée majoritairement dans le milieu deux fois plus concentré en acide lactique. De par la nature des isolats mettant en évidence une levée d'inhibition en présence d'acide lactique (bactéries lactiques), il semblerait que les phénomènes mis en évidence avec cette méthode ne soient pas toujours liés à une compétition nutritionnelle directe mais aussi à la fourniture de molécules utilisables directement en tant que sources de carbones et d'énergie, susceptibles de restaurer ou renforcer l'activité métabolique de *Salmonella*.

L'une de nos hypothèses, qui est la mise en œuvre d'un phénomène de compétition nutritionnelle, reste difficile à évaluer et il n'existe à l'heure actuelle aucune méthodologie de criblage rapide pouvant la mettre en évidence. Ici les isolats criblés n'avaient pas montré d'inhibition sur la première méthode de criblage par amensalisme et/ou antibiose. Des milieux tamponnés ont ici été utilisés afin d'éviter la sélection d'inhibition par effet pH. Cependant les conditions de culture ne sont pas les mêmes que pour la première méthodologie de criblage. De plus, comme évoqué précédemment, la modification du milieu de culture peut entraîner des changements dans la production de composés inhibiteurs. Il est également important de noter que les souches de *Salmonella* testées ont été différentes de la première méthode. En effet la souche de référence pour le sérovar Mbandaka possédait déjà une résistance à l'ampicilline et ne pouvait donc pas être utilisée

dans ce criblage. Cette méthodologie est un premier pas dans la mise au point d'une méthode pouvant caractériser des interactions entre deux isolats pour l'utilisation des nutriments en concentrations limitantes présents dans la matrice.

La mise en place d'outils méthodologiques pour la sélection de candidats bioprotecteurs reste encore à améliorer à l'heure actuelle. Dans cette étude, l'adaptation de méthodes classiques transposables à des matrices complexes et à de larges criblages était indispensable pour la sélection de bons candidats. Cette première méthode a permis de mettre en évidence différents mécanismes d'actions et la potentielle synergie avec la production de différents acides (lactique, acétique et succinique) mais également d'autres molécules tel que le peroxyde d'hydrogène. Cependant cette méthodologie pourra être améliorée afin d'obtenir des résultats semi-quantitatifs mais également dans la standardisation de la concentration des isolats testés. Bien que l'objectif initial était de mettre au point deux méthodes permettant un criblage complémentaire dans le cadre d'une méthodologie globale avec la mise en évidence de différents mécanismes d'actions, la seconde méthode ne semble pas mettre en évidence uniquement une compétition nutritionnelle directe. Cependant la mise au point de cette méthode permet d'apporter des pistes pour la mise en place d'une méthode classique de criblage pour la compétition nutritionnelle.

Cette étude permet de proposer une méthodologie globale de criblage pour la mise en évidence d'isolats inhibiteurs par divers mécanismes d'actions. La première approche proposée dans cette optique serait l'évaluation du potentiel inhibiteur par la méthode 1 et 2 en simultané, le tout sur des milieux de culture similaires et adaptés (gélifiés et liquide). Cette analyse simultanée sur les deux méthodes de criblage permettra de ne sélectionner des isolats actifs que sur l'une ou l'autre des méthodes. De plus, l'utilisation de milieux similaires permettra de ne perdre aucune activité lors de la mise en place des associations en milieu liquide. L'analyse des mécanismes d'action pourra être effectuée avec les méthodes en microplaque, l'analyse HPLC ainsi la mise en évidence de levée d'inhibition. D'autres tests tel que l'analyse des composés volatils pourront être effectués. Le test de prérequis permettant d'éliminer le plus d'isolats était l'analyse des résistances aux antibiotiques et il semble donc intéressant de commencer par celui-là. Les autres tests pourront être réalisés ensuite dans cet ordre : potentiel de production des amines biogènes, comportement vis-à-vis des ferments et innocuité sur modèle larves *Galleria mellonella*. Une fois ces tests réalisés la mise en place des associations par deux et trois pourra être effectué et le pool final testé en matrice réel. Le génome des

isolats des espèces finales sélectionnées sera à évaluer en dernier avant validation pour utilisation en industrie agro-alimentaire.

Sélection des candidats pour l'utilisation en transformation fromagère

Il n'existe pour le moment aucune procédure officielle pour la sélection d'isolats utilisables en tant qu'agents bioprotecteurs. L'objectif était donc de proposer une procédure de sélection reposant sur la sensibilité aux antibiotiques, la non-production d'amines biogènes, l'innocuité, le comportement vis-à-vis des ferments issus de la fromagerie, basée sur des essais *in vitro* et sur l'analyse du génome.

Dans un premier temps la mise en évidence de résistances aux antibiotiques des 77 isolats sélectionnés a été effectuée en prenant en compte les recommandations et les breakpoints issus de l'EFSA ainsi que de l'Eucast. Dans le cas d'une procédure efficace ce test semble figurer ici parmi les premiers à tester puisque 38% des isolats sélectionnés lors des deux criblages ont été éliminés. Cela confirme que malgré la présence de candidats très inhibiteurs, cette sélection est aussi importante que l'activité en elle-même. Le second test reposant sur l'évaluation du potentiel de production d'amines biogènes n'a permis d'éliminer que 3 isolats. Si ce test n'a pas été fortement discriminant ici il est indispensable dans le cadre de la sélection d'agents bioprotecteurs. Les deux espèces, *L. laudensis* UCMA 1343 et *A. urinaeequi* UCMA 5972, non présentes sur liste QPS et/ou FIL ont ensuite été validées après le test d'innocuité sur modèle *Galleria mellonella*. L'impact des 42 souches restantes sélectionnées sur la croissance des ferments et leur pouvoir acidifiant a été évalué. Le processus d'acidification des ferments était peu impacté par la présence des isolats. Seule la souche *L. lactis* UCMA 18022 a inhibé la croissance du ferment d'affinage 5.

Bien qu'il existe de nombreux tests pouvant être effectués, la procédure mise en place ici montre que l'analyse de résistances aux antibiotiques semble la plus discriminante. Viennent ensuite les analyses pour la production d'amines biogènes, l'innocuité sur modèle *Galleria* et enfin l'analyse de l'impact des candidats sur les ferments. La dernière étape, consistant en l'analyse des génomes des candidats retenus, est en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Association de candidats bioprotecteurs

Afin d'obtenir les conditions les plus discriminantes pour la sélection des associations finales et d'être en mesure de tester un grand nombre d'associations, les 41 isolats retenus à ce stade ont été testés dans les conditions utilisées pour la seconde méthodologie de criblage à des concentrations de 10^6 UFC/mL pour l'isolat et pour la souche de *Salmonella* UCMA 20269^{lux+}. Bien que non représentatives des concentrations retrouvées dans le lait, l'objectif ici était de mettre en évidence les isolats capables d'inhiber des concentrations aussi importantes afin de réduire la sélection finale. Les 15 isolats sélectionnés à partir de ce criblage ont ensuite été associés par deux afin de visualiser la potentialisation de l'inhibition. De par une plus forte variabilité des résultats obtenus en associations par deux, seuls les 10 isolats issus des combinaisons montrant une inhibition à 15 heures de culture sur en triplicatas biologiques ont été sélectionnés. De part une moins forte variabilité, la mise en association par trois des 10 isolats a permis d'identifier 16 associations inhibitrices et d'en sélectionner sept en fonction de leurs mécanismes d'action et du seuil d'inhibition le plus précoce.

Dès la mise en place des associations par deux il ne reste plus qu'un seul isolat issu du criblage 1. Cela pourrait s'expliquer par le changement de milieu de culture, passant d'un milieu gélosé lait à un milieu chimiquement défini lait. Comme évoqué précédemment il aurait pu être plus pertinent de se placer dans des conditions de culture identiques pour les deux criblages afin d'éviter la perte d'activité engendrée.

L'utilisation des conditions de température rencontrées en transformation fromagère ne nous a pas permis d'effectuer des cinétiques d'associations à 15°C en milieu fromage (début d'affinage). Il aurait été intéressant de pouvoir effectuer cette expérience afin de comparer les isolats sélectionnés avec ceux en milieu chimiquement défini lait. En effet ici nous pouvons émettre l'hypothèse que les associations sélectionnées à cette étape ne seront pas forcément efficaces une fois en conditions d'affinage.

Afin de valider l'activité inhibitrice en matrice, l'inhibition de *Salmonella* par les sept associations sélectionnées a été évaluée en lait écrémé reconstitué contre cinq souches de terrain appartenant à trois sérovars différents (Mbandaka, Montevideo et Ohio). Une inhibition par trois associations a pu être observée avec une diminution allant jusqu'à 2 logs par rapport à la croissance des souches seules. Les cinq isolats issus de ces trois associations font tous partie de la famille des bactéries lactiques. On y retrouve trois espèces différentes : *Lactococcus lactis*, *Lactococcus*

laudensis et *Leuconostoc citreum*. Ces trois associations ont été sélectionnées pour l'évaluation de l'activité anti-*Salmonella* en matrice fromagère ainsi que pour la réalisation des essais pilotes. Parmi les sept associations sélectionnées, une seule souche du criblage sur milieu gélosé est retrouvée, à savoir l'isolat UCMA 1676 de l'espèce *Lc. citreum* caractérisé pour la production d'acide lactique (6,5 g/L) et acétique (0,07 g/L). Cela pourrait s'expliquer par les différences de composition des milieux utilisés lors du criblage 1. En effet le changement de matrice pourrait ici modifier l'activité inhibitrice des isolats sélectionnés sur la méthode de criblage 1. Sur la méthode de criblage 2, au moins un isolat est retrouvé pour chaque catégorie de levée d'inhibition (acides aminés, vitamines, minéraux et acide lactique).

La mise au point d'associations a permis de mettre en évidence une potentialisation des isolats sélectionnés se traduisant par l'apparition d'une inhibition plus rapidement. L'hypothèse émise ici repose sur la complémentarité des mécanismes mis en jeux (production de composés et compétition pour les nutriments dans la matrice) et/ou des interactions positives au sein des associations. Cette complémentarité a également pu être observée lors des essais en lait et fromage avec une inhibition dès le début du processus de transformation jusqu'au 21^{ème} jour pour deux associations. Si une différence de 1 à 2 logs par rapport au témoin peut sembler basse, il est important de souligner qu'ici les expériences ont été réalisées de façon optimale pour la croissance de *Salmonella*. En effet, dans l'industrie laitière, les contaminations du lait cru par *Salmonella* n'atteignent jamais des concentrations aussi importantes que 10^3 UFC/mL et se situeraient aux alentours de 5 à 10 CFU/mL (Madec et al., 1992). Malgré des conditions plus proches de celles rencontrées en transformation fromagère et un niveau initial de concentration en *Salmonella* bien supérieur à ce qui peut être rencontré sur les terrain, deux associations ont conservé une activité inhibitrice. Il est à noter que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et que les résultats seront à confirmer.

L'importance du temps de contact entre les associations et *Salmonella* identifiée lors de l'inoculation sur matrice laitière a permis de cibler une autre étape du processus de fabrication pour l'ajout des associations. En effet sur les premiers essais réalisés en lait maturé et en caillé, aucune inhibition n'avait été retrouvée. Cependant si les résultats obtenus n'ont pas permis ici de mettre en évidence l'inhibition en matrice laitière ils ont ouvert des pistes de solutions intéressantes. En effet si l'implantation des associations en fin de maturation primaire est trop tardive il serait intéressant d'ajouter les associations plus tôt dans le processus de transformation. Il semble pertinent pour la

suite de considérer un ajout des agents bioprotecteurs directement dans le lait de grand mélange en début de maturation primaire et non après maturation.

Les suivis physico-chimiques et le dénombrement des flores se sont révélés similaires pour toutes les associations. Seuls quelques différences ont pu être observées lors de l'analyse des qualités organoleptiques. Cependant il est à souligner que ces tests n'ont été effectués que sur un seul fromage pour chacune des conditions et qu'il aurait été intéressant d'effectuer cela sur un panel plus complet afin de pouvoir dégager une vraie tendance. Enfin, une analyse métagénétique est en cours afin d'évaluer l'impact de l'ajout des ferments bioprotecteurs sur les communautés microbiennes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

La Normandie compte quatre fromages emblématiques d'Appellation d'Origine Protégée : le Camembert de Normandie, le Pont-L'Évêque, le Livarot et le Neufchâtel. La majorité de ces fromages à pâte molle sont produits au lait cru (75%) résultant en des caractéristiques organoleptiques exceptionnelles grâce à une microflore native abondante. Néanmoins ces caractéristiques impliquent également une sensibilité accrue à la présence de pathogènes, notamment *Salmonella enterica*, entraînant d'une part un lourd préjudice économique pour les producteurs de lait (lait non valorisable en AOP) et les transformateurs (destruction de produits), et d'autre part un potentiel risque sanitaire pour le consommateur. Afin de garantir la pérennité des fromages AOP Normands face à ce risque microbiologique, des mesures de maîtrise de *Salmonella* sont appliquées pour certaines et évaluées pour d'autres dans les élevages de vaches laitières (ex : vaccination). Ces mesures ne permettant pas d'éliminer le pathogène dans les élevages mais seulement de le réduire, il était nécessaire d'évaluer une solution complémentaire de maîtrise en aval : la bioprotection des fromages.

Afin de répondre à ce défi, le premier objectif était de développer deux méthodes complémentaires de criblage pour sélectionner des isolats provenant de l'environnement laitier ayant une activité antagoniste envers *Salmonella*. Contrairement aux méthodes existantes dans la littérature, l'application des méthodes mises au point dans le cadre de la thèse ont permis le criblage de plus de 1400 isolats de genres variés et dans des conditions physicochimiques proches de la transformation fromagère. Plusieurs isolats inhibiteurs, présentant des mécanismes d'action variés et une potentielle activité lors de la maturation secondaire et/ou de l'affinage du fromage ont ainsi pu être mis en évidence. Parmi les isolats sélectionnés, les modes d'action mis en évidence étaient de type production d'acides organiques, production de peroxyde d'hydrogène, et de type compétition nutritionnelle pour différents facteurs limitants retrouvés dans le lait (minéraux, vitamines, ...). Cette étude a pu mettre en avant la nécessité de développer de nouveaux outils pour la mise en évidence de la compétition nutritionnelle, d'améliorer les techniques classiques afin de pouvoir les appliquer à des matrices plus complexes, mais également la nécessité de mettre au point une procédure spécifique pour la sélection d'agents bioprotecteurs.

Le second objectif était d'investiguer divers types d'agents microbiens potentiellement inhibiteurs, bactéries et champignons microscopiques afin de sélectionner des agents bioprotecteurs utilisables en industrie alimentaire. En effet, le laboratoire MALIM disposant d'une importante

collection d'isolats de l'environnement laitier, il était intéressant de pouvoir disposer de méthodes permettant le criblage de bactéries lactiques (bien connues pour le potentiel de bioprotection et fortement représentées au sein de la collection) mais également permettant le criblage d'autres groupes microbiens peu étudiés pour leur potentiel de bioprotection. Néanmoins, malgré 1450 isolats testés, appartenant à au moins 54 genres différents, et la volonté de mettre en évidence d'autres groupes microbiens que les bactéries lactiques dans la bioprotection des matrices laitières, on constate que seules les bactéries lactiques restent à la fin du criblage. Il peut toutefois être noté que parmi les bactéries lactiques présentant un fort potentiel suite aux criblages effectués ont été retrouvés la quasi-totalité des isolats du genre *Aerococcus* ainsi que l'espèce méconnue *Lactococcus laudensis*. Cette dernière est par ailleurs présente dans les associations finales.

Le troisième objectif de cette étude était de mettre en place des associations d'agents inhibiteurs sur la base de la complémentarité de leurs modes d'action et de les valider en modèles *in vitro*. En effet, il était important ici dans le cadre de ce projet d'apporter des solutions sur la durée pour les producteurs et les transformateurs. L'utilisation de cocktails de souches peut en effet présenter différents intérêts. D'une part, cela permet potentiellement de limiter l'émergence d'isolats résistants pouvant s'opérer lors de l'utilisation de souches bioprotectrices uniques mais également de développer un peu de robustesse face à une éventuelle attaque phagique. Il est à noter que nous n'avons pas évalué ce point (spectre de sensibilité à différents phages) pour nos souches. D'autre part, la combinaison de micro-organismes ayant des activités inhibitrices diverses peut permettre de potentialiser l'effet barrière global. Dans le cadre de cette étude, la mise en place d'associations par deux (105 combinaisons) puis par trois (120 combinaisons) a, en effet, pu mettre en évidence une potentialisation de l'activité inhibitrice se traduisant par une plus grande rapidité d'action sur *Salmonella* pour au moins trois associations retenues. Enfin, en sélectionnant des candidats dans deux conditions physicochimiques traduisant deux étapes du processus de fabrication, cela permet de combiner des isolats qui pourront agir soit de manière séquentielle soit tout au long du processus. Dans le cadre de cette étude, sur les cinq isolats composant les deux associations ternaires prévalidées pour un transfert industriel, cinq isolats avaient une activité dans les conditions mimant la maturation du lait et deux isolats avaient une activité dans les conditions mimant l'affinage du fromage. On peut donc émettre l'hypothèse ici d'une activité tout au long du processus de transformation (de la maturation du lait à l'affinage du fromage).

Enfin, le quatrième objectif était d'expérimenter les associations sélectionnées pour leur application en transformation fromagère au laboratoire et en essais pilotes. Le suivi du potentiel anti-

Salmonella en matrice lait et fromage a permis de montrer que si l'on pouvait conserver une inhibition au cours du processus de transformation (pour deux associations sur trois dans cette étude), le temps de contact entre les agents bioprotecteurs et *Salmonella* était essentiel. En effet, sur des temps de contact plus courts l'activité inhibitrice n'était plus conservée. Les essais pilotes réalisés ont permis de valider l'utilisation de deux associations bioprotectrices composées de souches de l'espèce *Lactococcus lactis*, *L. laudensis* et *Leuconostoc citreum*. Ces résultats seront néanmoins à confirmer lors d'un second essai pilote réalisé sur cette même technologie fromagère.

La figure 55 ci-dessous représente l'ensemble des résultats de cette étude de manière simplifiée.

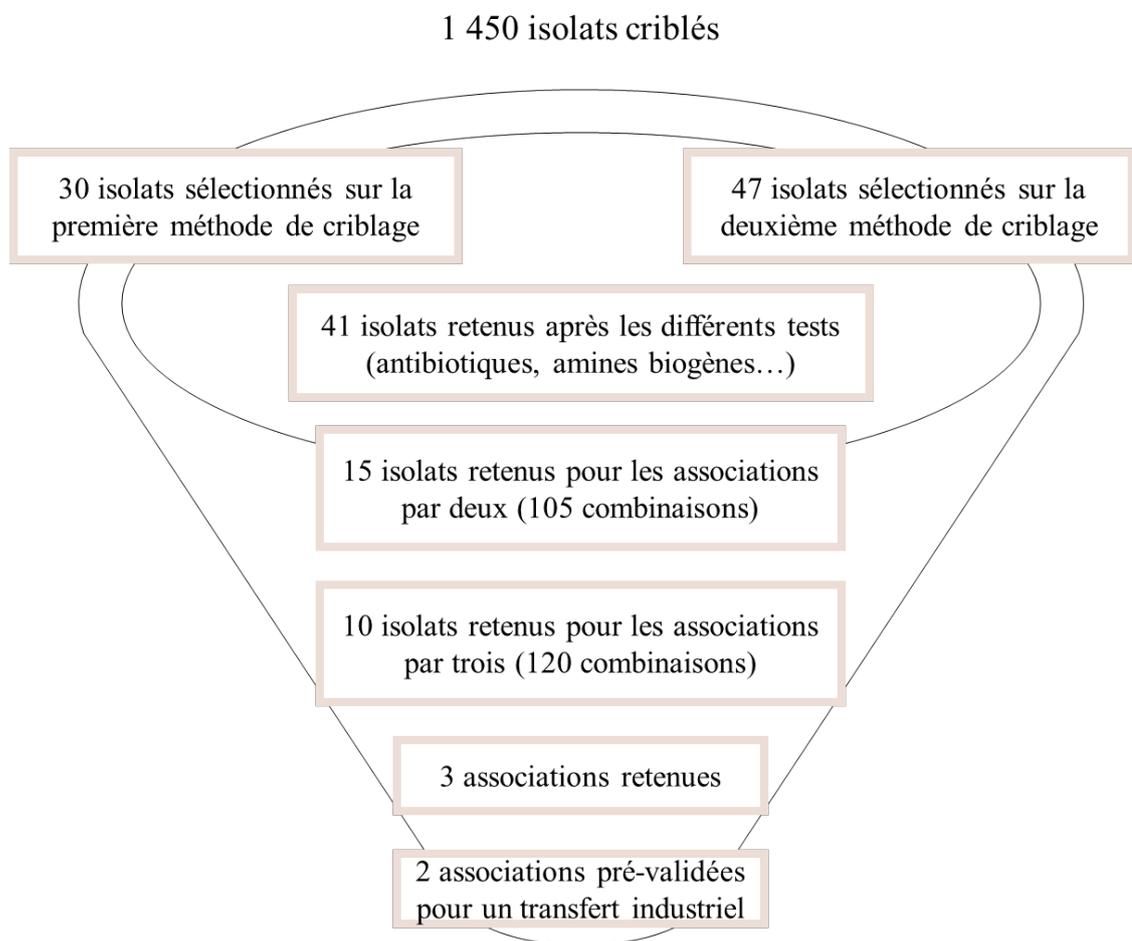


Figure 55 : Représentation générale des résultats de cette étude

De nouveaux essais pilotes sont actuellement en cours de réalisation sur le Camembert au lait cru mécanisé. Par ailleurs, d'autres essais seront également réalisés pour d'autres technologies fromagères : le Camembert de Normandie AOP et le Pont-l'Evêque AOP. Ces essais permettront d'une part de confirmer les premiers essais réalisés en Camembert au lait cru mécanisé et d'autre part d'évaluer l'impact sur deux autres technologies et le maintien ou non du pouvoir inhibiteur des associations.

Le génome complet des cinq isolats composant les associations sélectionnées est en cours de séquençage. Les résultats qui seront obtenus permettront d'une part d'avoir la carte d'identité de ceux-ci et d'autre part d'analyser *in silico* la présence de gènes de virulence ou encore de détecter des gènes de résistance à d'autres antibiotiques, par exemple. Cette dernière étape de caractérisation des isolats retenus est indispensable avant une éventuelle industrialisation notamment pour l'espèce *Lactococcus laudensis*. Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir effectuer les démarches nécessaires pour intégrer potentiellement cette espèce au sein de la liste FIL. Pour cela il faudrait tester tous les prérequis pour faire partie de cette liste (la résistance aux antibiotiques, la potentielle production d'amines biogènes, le comportement face à un panel plus important de ferments, analyse complète du génome) sur un nombre plus important d'isolats de cette espèce.

Afin d'explorer l'éventuel impact des associations sur l'équilibre du microbiote du fromage, une approche par métagénomique (ARNr 16S) a été réalisée sur les échantillons de Camembert au lait cru mécanisé à J+35. L'ADN extrait des échantillons a d'ores et déjà été envoyé pour analyse qui reste en attente à ce jour. Les résultats de cette analyse permettront d'apporter des réponses quant aux équilibres microbiens des flores technologiques en présence des associations. Si cette analyse ne permettra pas d'aller jusqu'à l'espèce, elle pourra mettre en avant les différences d'équilibres microbiens des différents genres par rapport au témoin.

Les deux méthodes de criblage ayant été développées dans le but d'être adaptables, elles pourraient être utilisées pour cribler de potentiels candidats bioprotecteurs envers d'autres pathogènes ou dans des conditions physicochimiques proches d'autres matrices alimentaires. D'après les études réalisées par l'EFSA on retrouve notamment *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et les *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines dans la matrice laitière sur lesquels ces méthodes pourraient être appliquées, notamment dans les filières plus sensibles.

Le criblage effectué dans des conditions proches des conditions physicochimiques du lait mûri et du fromage a, de manière intéressante, permis la mise en évidence du genre *Aerococcus*. Bien qu'appartenant au groupe des bactéries lactiques, ce genre n'est habituellement pas connu pour des applications de bioprotection et les études publiées portant sur les activités antimicrobiennes de ce genre restent rares. Il serait ainsi intéressant d'explorer plus en détail le potentiel inhibiteur de ce genre. En effet, cette étude a mis en évidence un fort pouvoir inhibiteur via un mécanisme d'action qui semble différent des autres bactéries lactiques testées. Dans cette étude la totalité des isolats actifs ont mis en évidence la présence d'une molécule éluée à 9,1 min en HPLC. Il serait intéressant de pouvoir déterminer si cette molécule est produite par tous les isolats actifs ou seulement par quelques souches. L'activité (après purification) du composé élué en HPLC à 9,1 min suivi de sa caractérisation, pourraient être réalisés. Pour les isolats testés dans cette étude, d'autres pics (en dehors de celui à 9,1 min) ont pu être visualisés pour l'ensemble des isolats. Il serait intéressant de pouvoir identifier toutes ces molécules et leur potentiel inhibiteur vis-à-vis de *Salmonella*. Enfin, l'intérêt de ce genre pour la production de molécules aromatiques pourrait être exploré via l'analyse des composés volatils.

Une autre perspective serait une approche beaucoup plus fine quant à la compréhension des mécanismes d'actions, directs et indirects, de la potentielle compétition nutritionnelle. Il serait important de pouvoir mettre en place des outils méthodologiques afin de caractériser une compétition directe ou indirecte. Pour cela les isolats à cribler pourraient être évalués en parallèle sur les deux méthodes de criblage dans les mêmes conditions (milieu chimiquement défini gélosé et liquide, criblage sur les mêmes souches de *Salmonella*) afin de réduire le biais entre les deux méthodes. La mise en évidence de la compétition nutritionnelle pourrait s'effectuer en utilisant des milieux modifiés avec seulement un élément précis (un acide aminé présent dans le lait ou une vitamine par exemple) afin de caractériser de manière précise l'élément impliqué dans cette compétition.

Il serait intéressant également de pouvoir évaluer l'impact des associations ternaires sélectionnées dans des conditions de contaminations plus proches de celles rencontrées en matrice laitière (< 10 UFC/ml dans le lait). En effet la technique utilisée ici pour le dénombrement du pathogène ne permettait pas de tester des concentrations en *Salmonella* inférieures à 10^3 UFC/mL, un inoculum de 10^6 UFC/ml a donc été utilisé dans cette étude. Il serait donc intéressant, à l'aide d'outils moléculaires tels que la qPCR, de pouvoir évaluer en temps réel et de manière plus précise la concentration en *Salmonella* avec un inoculum beaucoup plus faible. Dans un premier temps il

faudrait pouvoir déterminer le seuil minimal de détection afin de pouvoir adapter au mieux l'inoculum. Si malgré tout le seuil minimal est encore trop haut par rapport aux conditions réelles, il permettra néanmoins d'obtenir des informations plus précises et plus proches des conditions rencontrées par les producteurs et transformateurs.

Enfin, il convient de rappeler que le projet CESam était composé de deux axes. Le deuxième portant sur l'évaluation du potentiel de phages anti-*Salmonella*. En effet, même si à l'heure actuelle la réglementation ne permet pas l'introduction de phages en industrie agro-alimentaire en Union Européenne, il serait néanmoins intéressant de pouvoir évaluer la combinaison de phages et d'associations ternaires ensemble en laboratoire. Quelques phages ont pu être sélectionnés dans le cadre du projet CESam et l'analyse de leur génome sera effectué afin de « valider » leur potentiel d'utilisation. De par le contexte actuel de la pandémie, cette approche association bactéries-phages n'a pu être évaluée. La mise en place de cette perspective pourra s'effectuer à l'aide de la méthodologie 2 dans des conditions proches de la matrice (milieu chimiquement défini ou ultrafiltrat de lait/fromage) et avec, en parallèle, un suivi de la concentration en phage.

REFERENCES

REFERENCES

A

- Abhisingha, M., J. Dumnil, and C. Pitaksutheepong. 2017. Selection of Potential Probiotic *Lactobacillus* with Inhibitory Activity Against *Salmonella* and Fecal Coliform Bacteria. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 1–10. doi:10.1007/s12602-017-9304-8.
- Abo-Amer, A.E. 2007. Characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made yogurt. *Sci. Asia* 33:313–319.
- Adams, M.R., and C.J. Hall. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology* 23:287–292. doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb00581.x.
- Adetoye, A., E. Pinloche, B.A. Adeniyi, and F.A. Ayeni. 2018. Characterization and anti-*Salmonella* activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *BMC Microbiology* 18:96. doi:10.1186/s12866-018-1248-y.
- Afzal, M.I., C.C. Gonzalez Ariceaga, E. Lhomme, N.K. Ali, S. Payot, J. Burgain, C. Gaiani, F. Borges, A.-M. Revol-Junelles, S. Delaunay, and C. Cailliez-Grimal. 2013. Characterization of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 for its positive technological role in soft cheese making. *Food Microbiology* 36:223–230. doi:10.1016/j.fm.2013.05.008.
- Agriopoulou, S., E. Stamatelopoulou, M. Sachadyn-Król, and T. Varzakas. 2020. Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. *Microorganisms* 8:952. doi:10.3390/microorganisms8060952.
- ANSES. 2011. Inventaire des *Salmonella* d'origine non humaine.
- ANSES. 2017. Inventaire des *Salmonella* d'origine non humaine.
- Ashenafi, M. 1993. Fate of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* during the fermentation of ergo, a traditional Ethiopian sour milk. *Ethiop. Med. J.* 31:91–98.
- Ashenafi, M., and F. Beyene. 1994. Microbial load, microflora and keeping quality of raw and pasteurized milk from a dairy farm. *Bulletin of animal health and production in Africa*.
- Atanassova, M., Y. Choiset, M. Dalgalarondo, J.-M. Chobert, X. Dousset, I. Ivanova, and T. Haertlé. 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology* 87:63–73. doi:10.1016/S0168-1605(03)00054-0.
- Atıcı, S., Z. Alp Ünkar, S. Öcal Demir, G. Akkoç, N. Yakut, Ş. Yılmaz, K. Erdem, A. Çınar

Memişoğlu, N. Ülger, A. Soysal, E. Özek, and M. Bakır. 2018. A rare and emerging pathogen: *Raoultella planticola* identification based on 16S rRNA in an infant. *Journal of Infection and Public Health* 11:130–132. doi:10.1016/j.jiph.2017.03.006.

Axelsson, L.T., T.C. Chung, W.J. Dobrogosz, and S.E. Lindgren. 1989. Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2:131–136. doi:10.3109/08910608909140210.

B

Ballester, J.M., M. Ballester, and J.P. Belaïch. 1977. Viridicine: a bacteriocine from *Aerococcus viridans*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 128A:393–400.

Baroiller, C., J.L. Schmidt, and M. Lapadu-Hargues. 1990. Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Lait* 70:67–84. doi:10.1051/lait:199017.

Barrett, E., M. Hayes, P. O'Connor, G. Gardiner, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, R.P. Ross, and C. Hill. 2007. Salivaricin P, One of a Family of Two-Component Antilisterial Bacteriocins Produced by Intestinal Isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3719–3723. doi:10.1128/AEM.00666-06.

Bederke, G., and P.V. Lundt. 1954. Ergebnisse der Zusammenarbeit von Veterinar und Humanmedizin bei der Paratyphusbekämpfung im ostfriesischen Inselgebiet. *Deut. tierärztl. Wochenschr.* 52–61.

Begon, M., C.R. Townsend, and J.L. Harper. 2009. *Ecology: from individuals to ecosystems*.

Belkum, M.J. van, J. Kok, G. Venema, H. Holo, I.F. Nes, W.N. Konings, and T. Abee. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner.. *Journal of Bacteriology* 173:7934–7941. doi:10.1128/jb.173.24.7934-7941.1991.

Benjamin, W.H., C.L. Turnbough, B.S. Posey, and D.E. Briles. 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid.. *Infect Immun* 50:392–397.

Bevilacqua, L., M. Ovidi, E. Di Mattia, L.D. Trovatelli, and F. Canganella. 2003. Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiological Research* 158:179–185. doi:10.1078/0944-5013-00192.

Bian, X., S.E. Evivie, Z. Muhammad, G.-W. Luo, H.-Z. Liang, N.-N. Wang, and G.-C. Huo. 2016. In vitro assessment of the antimicrobial potentials of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from traditional cheese in Sinkiang China against food-borne pathogens. *Food Funct* 7:789–797. doi:10.1039/c5fo01041a.

- Bismuth, H., L. Aussel, and B. Ezraty. 2019. La teigne *Galleria mellonella* pour les études hôte-pathogène. *Med Sci (Paris)* 35:346–351. doi:10.1051/medsci/2019071.
- Bleicher, A., T. Stark, T. Hofmann, B. Bogovic Matijasić, I. Rogelj, S. Scherer, and K. Neuhaus. 2010. Potent antilisterial cell-free supernatants produced by complex red-smear cheese microbial consortia. *J. Dairy Sci.* 93:4497–4505. doi:10.3168/jds.2010-3244.
- 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. doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.022.
- Boloh, Y. 1994. Rôle des matières premières dans la contamination des aliments, Compte-rendu de la Session “Salmonellose bovine” pp 117-120.
- Bordin, G., F. Cordeiro Raposo, B. de la Calle, and A.R. Rodriguez. 2001. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 928:63–76. doi:10.1016/S0021-9673(01)01097-4.
- Bouton, Y., S. Buchin, G. Duboz, S. Pochet, and E. Beuvier. 2009. Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiology* 26:183–191. doi:10.1016/j.fm.2008.09.002.
- Bover-Cid, S., and W.H. Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53:33–41. doi:10.1016/S0168-1605(99)00152-X.
- Breitenwieser, F., E.V. Doll, T. Clavel, S. Scherer, and M. Wenning. 2020. Complementary Use of Cultivation and High-Throughput Amplicon Sequencing Reveals High Biodiversity Within Raw Milk Microbiota. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01557.
- Brewer, M.T., K.L. Anderson, I. Yoon, M.F. Scott, and S.A. Carlson. 2014. Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary Microbiology* 172:248–255. doi:10.1016/j.vetmic.2014.05.026.
- Brul, S., and P. Coote. 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50:1–17. doi:10.1016/S0168-1605(99)00072-0.
- Buret, Y. 1997. Conduite à tenir hors thérapeutique dans un élevage présentant une expression clinique de salmonellose. *Bull. des GTV* 2:75–46.

C

- 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* 30:547–560. doi:10.1016/j.syapm.2007.05.004.

- Camart-Périé, A. 2006. *Salmonella*, salmonelloses bovines : état des lieux, épidémiologie en France. Thèse vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil,.
- Carr, F.J., D. Chill, and N. Maida. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28:281–370. doi:10.1080/1040-840291046759.
- Casey, M.G., J.P. Häni, J. Gruskovnjak, W. Schaeren, and D. Wechsler. 2006. Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Lait* 86:407–414. doi:10.1051/lait:2006020.
- Castillo, N.A., A. de Moreno de LeBlanc, C. M Galdeano, and G. Perdigón. 2013. Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic *Lactobacilli*. *J. Appl. Microbiol.* 114:861–876. doi:10.1111/jam.12074.
- Cateau, E., Y. Héchard, and M.-H. Rodier. 2014. Les amibes libres: un danger méconnu. *Revue Francophone des Laboratoires* 2014:41–51. doi:10.1016/S1773-035X(14)72404-9.
- CDC. 2016. National Enteric Disease Surveillance Salmonella annual report.
- Chai, L.C., B.H. Kong, O.I. Elemfareji, and K.L. Thong. 2012. Variable Carbon Catabolism among *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolates. *PLOS ONE* 7:e36201. doi:10.1371/journal.pone.0036201.
- Chen, L., Q. Gu, P. Li, Y. Li, D. Song, and J. Yang. 2018. Purification and Characterization of Plantaricin ZJ316, a Novel Bacteriocin against *Listeria monocytogenes* from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *J Food Prot* 81:1929–1935. doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-306.
- Chiu, H.-H., C.-C. Tsai, H.-Y. Hsieh, and H.-Y. Tsen. 2008. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice. *Journal of Applied Microbiology* 104:605–612. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03573.x.
- Choisy, C., M. Desmazeaud, J.C. Gripon, G. Lamberet, and J. Lenoir. 1997a. La biochimie de l’affinage. Eck A., Gillis J.C. (Eds.), *Le Fromage*, Lavoisier, Paris 86–161.
- Choisy, C., M. Desmazeaud, M. Gueguen, J. Lenoir, J.L. Schmidt, and C. Tourneur. 1997b. *Le fromage - Les phénomènes microbiens*. Lavoisier Tec et Doc.
- CNAOL. 2017. Des produits sous signes de la qualité et de l’origine. Produits laitiers AOP et IGP.
- CNIEL. 2020. L’économie laitière en chiffres - Édition 2020. Accessed August 25, 2020. <https://www.cniel-infos.com/Record.htm?record=10262398124920805709>.
- Cogan, T.M., S. Goerges, R. Gelsomino, S. Larpin, M. Hohenegger, N. Bora, E. Jamet, M.C. Rea, J. Mounier, M. Vancanneyt, M. Guéguen, N. Desmases, J. Swings, M. Goodfellow, A.C. Ward, H. Sebastiani, F. Irlinger, J.-F. Chamba, R. Beduhn, and S. Scherer. 2014. Biodiversity of the Surface Microbial Consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses.

- Microbiology Spectrum 2. doi:10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012.
- Corbion, B., A. Joly, J.L. Martel, P. Pardon, and F. Schelcher. 1995. Salmonellose bovine. G.D.S info 120.
- Coton, E., and M. Coton. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 63:296–304. doi:10.1016/j.mimet.2005.04.001.
- Coton, M., A. Romano, G. Spano, K. Ziegler, C. Vetrana, C. Desmarais, A. Lonvaud-Funel, P. Lucas, and E. Coton. 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology* 27:1078–1085. doi:10.1016/j.fm.2010.07.012.
- Cotter, P.D., C. Hill, and R.P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro1273.
- Courtet Leymarios, F. 2010. Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil,.
- Crook, J.A., P.V. Rossitto, J. Parko, T. Koutchma, and J.S. Cullor. 2015. Efficacy of Ultraviolet (UV-C) Light in a Thin-Film Turbulent Flow for the Reduction of Milkborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease* 12:506–513. doi:10.1089/fpd.2014.1843.
- Csapó, J., and N.Zs. Csapón. 2002. A tej és tejtermékek a táp- lálkozásban (Milk and milk products in human nutrition) *Mezőgazda Kiadó*:1–464.
- Csapó, J., and N.Zs. Csapón. 2009. A tehéntej táplálkozástudományi szempontból legfontosabb összetevői: 1. Fehérje tartalom és aminosav összetétel, zsírtartalom és zsírsav összetétel pp 147-16.
- Cui, Y., C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, X. Qu, and H. Cui. 2012. Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International Journal of Molecular Sciences* 13:16668–16707. doi:10.3390/ijms131216668.
- Cunrath, O., and D. Bumann. 2019. Host resistance factor SLC11A1 restricts *Salmonella* growth through magnesium deprivation. *Science* 366:995–999. doi:10.1126/science.aax7898.
- Curone, G., J. Filipe, P. Cremonesi, E. Trevisi, M. Amadori, C. Pollera, B. Castiglioni, L. Turin, V. Tedde, D. Vigo, P. Moroni, A. Minuti, V. Bronzo, M.F. Addis, and F. Riva. 2018. What we have lost: Mastitis resistance in Holstein Friesians and in a local cattle breed. *Research in Veterinary Science* 116:88–98. doi:10.1016/j.rvsc.2017.11.020.

D

-
- Dalmasso, M., S. Prestoz, V. Rigobello, and Y. Demarigny. 2008. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food sci. technol. int.* 14:469–477. doi:10.1177/1082013208100533.

- Dandekar, T., F. Astrid, P. Jasmin, and M. Hensel. 2012. *Salmonella enterica*: a surprisingly well-adapted intracellular lifestyle. *Frontiers in Microbiology* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00164.
- D'Aoust, J.-Y. 1994. *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology* 24:11–31. doi:10.1016/0168-1605(94)90103-1.
- D'aoust, J.-Y., D.W. Warburton, and A.M. Sewell. 1985. *Salmonella typhimurium* Phage-Type 10 from Cheddar Cheese Implicated in a Major Canadian Foodborne Outbreak. *J Food Prot* 48:1062–1066. doi:10.4315/0362-028X-48.12.1062.
- Davis, M.A., D.D. Hancock, D.H. Rice, D.R. Call, R. DiGiacomo, M. Samadpour, and T.E. Besser. 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology* 95:199–210. doi:10.1016/S0378-1135(03)00159-7.
- Davison, H.C., A.R. Sayers, R.P. Smith, S.J.S. Pascoe, R.H. Davies, J.P. Weaver, and S.J. Evans. 2006. Risk factors associated with the *salmonella* status of dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 159:871–880.
- Deegan, L.H., P.D. Cotter, C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16:1058–1071. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
- Denis, C., N. Demasures, M. Guéguen, and C. Loheac. 2003. Etude du lien entre la nature de la flore prairiale et les caractéristiques des laits crus normands. Influence de cette diversité sur la qualité des produits laitiers. Rapport d'étude.
- Denis, C., M. Gueguen, E. Henry, and D. Levert. 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81:365–379. doi:10.1051/lait:2001138.
- Desfossés-Foucault, É., G. LaPointe, and D. Roy. 2014. Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *International Journal of Food Microbiology* 178:76–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.004.
- Desjouis, G., H. Spennick, and J.L. Martel. 1997. Diagnostic et traitement des salmonelloses cliniques des bovins. *Bulletin des GTV* pp 67-72.
- Desmassures, N. 1995. Etude de laits de haute qualité : caractéristiques et aptitude microbiologique à la transformation en camembert au lait cru. Thèse. Université de Caen,.
- Desmassures, N., F. Bazin, and M. Guéguen. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* 83:53–58. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00166.x.
- Desmassures, N., and F. Irlinger. 2018. In *Le fromage*, 4ème édition - Chapitre 7 : Microorganismes

- d'affinage : levures, moisissures et bactéries. p209-318.
- Dewey-Mattia, D., H. Kisselburgh, K. Manikonda, R. Silver, S. Subramhanya, P. Sundararaman, H. Whitham, and S. Crowe. 2017. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — 2017 Annual report 15.
- Diep, D.B., L. Godager, D. Brede, and I.F. Nes. 2006. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology*, 152:1649–1659. doi:10.1099/mic.0.28794-0.
- Dieuleveux, V., D. Van Der Pyl, J. Chataud, and M. Gueguen. 1998. Purification and Characterization of Anti-*Listeria* Compounds Produced by *Geotrichum candidum*. *Appl Environ Microbiol* 64:800–803.
- Dos Anjos, C., F.P. Sellera, L.M. de Freitas, R.G. Gargano, E.O. Telles, R.O. Freitas, M.S. Baptista, M.S. Ribeiro, N. Lincopan, F.C. Pogliani, and C.P. Sabino. 2020. Inactivation of milk-borne pathogens by blue light exposure. *Journal of Dairy Science* 103:1261–1268. doi:10.3168/jds.2019-16758.
- Douesnard-Malo, F., and F. Daigle. 2011. Increased Persistence of *Salmonella enterica* Serovar Typhi in the Presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 77:7640–7646. doi:10.1128/AEM.00699-11.
- Doyle, C.J., D. Gleeson, P.W. O'Toole, and P.D. Cotter. 2017a. Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. doi:10.1128/AEM.02694-16.
- Doyle, C.J., D. Gleeson, P.W. O'Toole, and P.D. Cotter. 2017b. High-throughput metataxonomic characterization of the raw milk microbiota identifies changes reflecting lactation stage and storage conditions. *International Journal of Food Microbiology* 255:1–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.019.
- Doyle, M.P. 1989. *Food Bacterial Pathogen*. CRC Press. Marcel Dekker Inc. New York.
- Drider, D., and S. Rebuffat. 2011. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Science & Business Media, New York. 451 pages.

E

- EFSA. 2012. Guidance on the Assessment of Bacterial Antimicrobial Susceptibility. Accessed July 8, 2020. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2740>.
- EFSA and ECDC. 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.
- EFSA, K. Koutsoumanis, A. Allende, A. Alvarez-Ordóñez, D. Bolton, S. Bover-Cid, M. Chemaly,

- R. Davies, A. De Cesare, F. Hilbert, R. Lindqvist, M. Nauta, L. Peixe, G. Ru, M. Simmons, P. Skandamis, E. Suffredini, P.S. Cocconcelli, P.S. Fernandez Escamez, M.P. Maradona, A. Querol, J.E. Suarez, I. Sundh, J. Vlak, F. Barizzone, S. Correia, and L. Herman. 2019. The list of QPS status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA. doi:10.5281/zenodo.3336268.
- EFSA, A. Ricci, A. Allende, D. Bolton, M. Chemaly, R. Davies, R. Girones, K. Koutsoumanis, L. Herman, R. Lindqvist, B. Nørrung, L. Robertson, G. Ru, M. Sanaa, M. Simmons, P. Skandamis, E. Snary, N. Speybroeck, B. Ter Kuile, J. Threlfall, H. Wahlström, P.S. Cocconcelli, G. Klein (deceased), L. Peixe, M.P. Maradona, A. Querol, J.E. Suarez, I. Sundh, J. Vlak, S. Correia, and P.S. Fernández Escámez. 2017. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. EFSA Journal 15. doi:10.2903/j.efsa.2017.4663.
- Eisemann, C.H., W.K. Jorgensen, D.J. Merritt, M.J. Rice, B.W. Cribb, P.D. Webb, and M.P. Zalucki. 1984. Do insects feel pain? — A biological view. *Experientia* 40:164–167. doi:10.1007/BF01963580.
- El Kheir, S.M., L. Cherrat, A.A. Awussi, N.E. Ramia, S. Taha, A. Rahman, D. Passerini, F. Leroi, J. Petit, C. Mangavel, A.-M. Revol-Junelles, and F. Borges. 2018. High-Throughput Identification of Candidate Strains for Biopreservation by Using Bioluminescent *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01883.
- Eliskases-Lechner, F., M. Guéguen, and J.-M. Panoff. 2011. Yeasts and Molds | *Geotrichum candidum*. Encyclopedia of Dairy Sciences.
- Elser, J.L., A.L.A. Progar, K.M.M. Steensma, T.P. Caskin, S.R. Kerr, and S.A. Shwiff. 2019. Economic and livestock health impacts of birds on dairies: Evidence from a survey of Washington dairy operators. *PLOS ONE* 14:e0222398. doi:10.1371/journal.pone.0222398.
- Ennahar, S., O. Assobhei, and C. Hasselmann. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a Smear-Surface Soft Cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a Pediocin AcH Producer. *J Food Prot* 61:186–191. doi:10.4315/0362-028X-61.2.186.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* 24:85–106. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x.
- Euzéby, J.P. 1999. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49:927–930. doi:10.1099/00207713-49-2-927.
- Evans, S., and R. Davis. 1996. Case control study of multiple-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 infection of cattle in Great Britain. *Vet records* 139:557–558.

Even, S., C. Charlier, S. Nouaille, N.L.B. Zakour, M. Cretenet, F.J. Cousin, M. Gautier, M. Cocaign-Bousquet, P. Loubière, and Y.L. Loir. 2009. *Staphylococcus aureus* Virulence Expression Is Impaired by *Lactococcus lactis* in Mixed Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4459–4472. doi:10.1128/AEM.02388-08.

F

Falguni, P., V. Shilpa, and B. Mann. 2010. Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02. *International Journal of Dairy Technology* 63:70–76. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00553.x.

FAO. 1998. *Le Lait et Les Produits Laitiers Dans La Nutrition Humaine*. Collection FAO : Alimentation et nutrition n°28.

FAO. 2012. *Pertes et gaspillages alimentaires dans le monde: ampleur, causes et prévention*. FAO, Rome.

Farhan, M., and S. Salik. 2007. Evaluation of bacteriological contamination in raw (un-processed) milk sold in different regions of Lahore (Pakistan). *Journal of Agriculture and Social Sciences (Pakistan)* 3:104–106.

Farrell, H.M., R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, and H.E. Swaisgood. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* 87:1641–1674. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6.

Fayol-Messaoudi, D., M.-H. Coconnier-Polter, V.L.-L. Moal, F. Atassi, C.N. Berger, and A.L. Servin. 2007. The *Lactobacillus plantarum* strain ACA-DC287 isolated from a Greek cheese demonstrates antagonistic activity in vitro and in vivo against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Applied Microbiology* 103:657–665. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03293.x.

FDA. 1998. *Salmonella* In: The “Bad Bug Book”, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Center for Food Safety & Applied Nutrition, US Food & Drug Administration, Washington DC. 292 pages.

Felis, G.E., and F. Dellaglio. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria *Curr. Issues Intest. Microbiol.*:44–61.

Ferrari, I. da S., J.V. de Souza, C.L. Ramos, M.M. da Costa, R.F. Schwan, and F.S. Dias. 2016. Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. *Food Microbiology* 60:29–38. doi:10.1016/j.fm.2016.06.014.

- Ferreira, I.M.P.L.V.O., E. Mendes, A.M.P. Gomes, M.A. Faria, and M.A. Ferreira. 2001. The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection. *Food Chemistry* 74:239–244. doi:10.1016/S0308-8146(01)00133-9.
- Fox, P.F., T. Uniacke-Lowe, P.L.H. McSweeney, and J.A. O'Mahony. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. P.F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P.L.H. McSweeney, and J.A. O'Mahony, ed. Springer International Publishing, Cham.
- Fricker, M., B. Skånseng, K. Rudi, B. Stessl, and M. Ehling-Schulz. 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International Journal of Food Microbiology* 145:S24–S30. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025.

G

- Gabrielsen, C., D.A. Brede, I.F. Nes, and D.B. Diep. 2014. Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:6854–6862. doi:10.1128/AEM.02284-14.
- Gal-Mor, O., E.C. Boyle, and G.A. Grassl. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00391.
- Garnier, L., M. Penland, A. Thierry, M.-B. Maillard, J. Jardin, M. Coton, M. Leyva Salas, E. Coton, F. Valence, and J. Mounier. 2020. Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *International Journal of Food Microbiology* 322:108574. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108574.
- Garnier, L., M.L. Salas, N. Pinon, N. Wiernasz, A. Pawtowski, E. Coton, J. Mounier, and F. Valence. 2018. Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *Journal of Dairy Science* 101:4971–4976. doi:10.3168/jds.2017-13518.
- Gavrish, E.Yu., V.I. Krauzova, N.V. Potekhina, S.G. Karasev, E.G. Plotnikova, O.V. Altyntseva, L.A. Korosteleva, and L.I. Evtushenko. 2004. Three New Species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., and *Brevibacterium permense* sp. nov.. *Microbiology* 73:176–183. doi:10.1023/B:MICI.0000023986.52066.1e.
- Gerez, C.L., M.J. Torres, G. Font de Valdez, and G. Rollán. 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control* 64:231–237. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.10.009.
- Geria, M., A. Dambrosio, G. Normanno, V. Lorusso, and A. Caridi. 2014. Antagonistic activity of dairy lactobacilli against gram-foodborne pathogens. *Acta Sci. Technol.* 36:1–16. doi:10.4025/actascitechnol.v36i1.18776.
- Gibson, E.A. 1965. *Salmonella* infection in cattle. *Journal of Dairy Reserch, Section E. Diseases of dairy cattle*. doi:10.1017/s0022029900018410.

- Gil, A., and F. Sanchez-Medina. 1981. Acid-soluble nucleotides of cow's, goat's and sheep's milks, at different stages of lactation. *Journal of Dairy Research* 48:35–44. doi:10.1017/S0022029900021427.
- Gill, B.D., and H.E. Indyk. 2007a. Determination of Nucleotides and Nucleosides in Milks and Pediatric Formulas: A Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 90:1354–1364. doi:10.1093/jaoac/90.5.1354.
- Gill, B.D., and H.E. Indyk. 2007b. Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas. *International Dairy Journal* 17:596–605. doi:10.1016/j.idairyj.2006.08.001.
- Gillor, O., A. Etzion, and M.A. Riley. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:591–606. doi:10.1007/s00253-008-1726-5.
- Glickman, L.T., P.L. McDonough, S.J. Shin, J.M. Fairbrother, R.L. LaDue, and S.E. King. 1981. Bovine salmonellosis attributed to *Salmonella* anatum-contaminated haylage and dietary stress. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178:1268–1272.
- Goepfert, J.M., and R. Hicks. 1969. Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 97:956–958.
- Gong, H.-S., X.-C. Meng, and H. Wang. 2010. Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella typhimurium*. *Journal of Basic Microbiology* 50:S37–S45. doi:10.1002/jobm.201000130.
- Gottschalk, G. 1986. Regulation of Bacterial Metabolism. G. Gottschalk, ed. Springer Series in Microbiology. Springer, New York, NY.
- Gould, G.W. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology* 33:51–64. doi:10.1016/0168-1605(96)01133-6.
- Graet, Y.L., A. Lepienne, G. Brule, and P. Ducruet. 1983. Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Lait* 63:317–332. doi:10.1051/lait:1983629-63019.
- Gram, L., L. Ravn, M. Rasch, J.B. Bruhn, A.B. Christensen, and M. Givskov. 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78:79–97. doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.
- Gregory, M. 1975. Water-soluble vitamins in milk and milk products. *Journal of Dairy Research*.
- Grimont, P.A.D., and F.-X. Weill. 2007. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. Collab. OMS Référence Rech. Sur Salmonella 167 pages.
- Gronstol, H., A.D. Osborne, and S. Pethiyagoda. 1974. Experimental *Salmonella* infection in calves.

2. Virulence and the spread of infection. *J Hyg (Lond)* 72:163–168. doi:10.1017/s0022172400023354.
- Gueguen, M. 1984. Contribution à la connaissance de *Geotrichum candidum* et notamment de sa variabilité: conséquence pour l'industrie fromagère. Thèse. Université de Caen. 487 pages.
- Guetouache, M., B. Guessas, and S. Medjekal. 2014. Composition and Nutritional Value of Raw Milk. Accessed April 30, 2020. <https://www.semanticscholar.org/paper/Composition-and-nutritional-value-of-raw-milk-Guetouache-Guessas/d0f52c658d4a4196d54c759ef98cf31d8fd47816>.
- Guichard, H., and P. Bonnarne. 2005. Development and validation of a plate technique for screening of microorganisms that produce volatile sulfur compounds. *Analytical Biochemistry* 338:299–305. doi:10.1016/j.ab.2004.12.027.
- Guinee, T.P., and P.F. Fox. 1993. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. P.F. Fox, ed. Springer US, Boston, MA.
- Gutnick, D., J.M. Calvo, T. Klopotoski, and B.N. Ames. 1969. Compounds Which Serve as the Sole Source of Carbon or Nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT-2. *J Bacteriol* 100:215–219.
- Guyomarc'h, F., A. Binet, and L. Dufossé. 2000. Characterization of *Brevibacterium linens* pigmentation using spectrophotometry. *International Journal of Food Microbiology* 57:201–210. doi:10.1016/S0168-1605(00)00252-X.

H

- Haines, W.C., and L.G. Harmon. 1973. Effect of Selected Lactic Acid Bacteria on Growth of *Staphylococcus aureus* and Production of Enterotoxin1. *Appl Microbiol* 25:436–441.
- Hanson, D.L., G.H. Loneragan, T.R. Brown, D.J. Nisbet, M.E. Hume, and T.S. Edrington. 2016. Evidence supporting vertical transmission of *Salmonella* in dairy cattle. *Epidemiology & Infection* 144:962–967. doi:10.1017/S0950268815002241.
- Hassan, A.N., and J.F. Frank. 2011. Microorganism associated with milk. J.W. Fuquay, ed. Academic Press, San Diego. p 447-457.
- Héchar, Y., B. Dériard, F. Letellier, and Y. Cenatiempo. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Microbiology*, 138:2725–2731. doi:10.1099/00221287-138-12-2725.
- Helander, I.M., A. von Wright, and T.-M. Mattila-Sandholm. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 8:146–150. doi:10.1016/S0924-2244(97)01030-3.
- Henri-Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Guéguen. 2004. Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in “Camembert de

- Normandie” cheese. *Lait* 84:179–189. doi:10.1051/lait:2003037.
- Henri-Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Guéguen. 2008. Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Can. J. Microbiol.* 54:218–228. doi:10.1139/W07-137.
- Héquet, A., V. Laffitte, L. Simon, D. De Sousa-Caetano, C. Thomas, C. Fremaux, and J.-M. Berjeaud. 2007. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology* 113:67–74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.016.
- Herrero-Fresno, A., N. Martínez, E. Sánchez-Llana, M. Díaz, M. Fernández, M.C. Martin, V. Ladero, and M.A. Alvarez. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* 157:297–304. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002.
- Heuchel, V., and J. Marly. 2003. La contamination du lait de vache par les Salmonelles. *Bull. des GTV* 18:53–57.
- Heuchel, V., J. Marly, and N. Meffe. 2000. Origine et moyens de maîtrise à la production de la contamination du lait de vache par Salmonelles. Pages 1–62 in *Compte-Rendu*.
- Hockett, K.L., and D.A. Baltrus. 2017. Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J Vis Exp*. doi:10.3791/55064.
- Hogan, J.S., K.H. Hoblet, K.L. Smith, D.A. Todhunter, P.S. Schoenberger, W.D. Hueston, D.E. Pritchard, G.L. Bowman, L.E. Heider, B.L. Brockett, and H.R. Conrad. 1988. Bacterial and Somatic Cell Counts in Bulk Tank Milk from Nine Well Managed Herds¹. *J Food Prot* 51:930–934. doi:10.4315/0362-028X-51.12.930.
- Holm, C., L. Jepsen, M. Larsen, and L. Jespersen. 2004. Predominant Microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science* 87:1151–1157. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73263-4.
- Holschbach, C.L., and S.F. Peek. 2018. *Salmonella* in Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 34:133–154. doi:10.1016/j.cvfa.2017.10.005.
- Holzapfel, W., and B. Wood. 1995. *The Lactic Acid Bacteria: The genera of lactic acid bacteria*. Springer.
- Hoogstral, H. 1986. Theobald Smith: His Scientific Work and Impact. *Bull Entomol Soc Am* 32:22–35. doi:10.1093/besa/32.1.22.
- House, J.K., B.P. Smith, K. O’Connell, and D.C. VanMetre. 2001. Isotype-Specific Antibody Responses of Cattle to *Salmonella* Dublin Lipopolysaccharide and Porin Following *Salmonella*

- Dublin Vaccination and Acute and Chronic Infection. *J VET Diagn Invest* 13:213–218. doi:10.1177/104063870101300305.
- Howe, K., A. Karsi, P. Germon, R.W. Wills, M.L. Lawrence, and R.H. Bailey. 2010. Development of stable reporter system cloning luxCDABE genes into chromosome of *Salmonella enterica* serotypes using Tn7 transposon. *BMC microbiology* 10:197.
- Humbert, F., L. Sautra, M. Federighi, and J.L. Jouve. 1998. Les salmonelles.. Polytechnica. Paris Manuel de bactériologie alimentaire:308.
- Hunt, P.R. 2017. The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology* 37:50–59. doi:10.1002/jat.3357.

I

- Iandolo, J.J., C.W. Clark, L. Bluhm, and Z.J. Ordal. 1965. Repression of *Staphylococcus aureus* in Associative Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 13:646–649.
- IDF. 2018. Bulletin of the IDF N° 495/ 2018: Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. IDF Publications Catalogue.
- Imran, M., N. Desmasures, and J.-P. Vernoux. 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiol.* 27:1095–1103. doi:10.1016/j.fm.2010.07.016.
- Imran, M., J. Vernoux, J. Ledauphin, B. Bernay, and N. Desmasurs. 2012. Etude des effets barrière de communautés microbiennes modèles à activité anti-*Listeria* en microcosme fromager. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants* 245–247.
- Institut de l'élevage. 2016. Les micro-organismes intervenant dans l'affinage des fromages à pâte lactique.
- Iram, S.H., and J.E. Cronan. 2006. The β -Oxidation Systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Are Not Functionally Equivalent. *J Bacteriol* 188:599–608. doi:10.1128/JB.188.2.599-608.2006.
- Irlinger, F., S. Layec, S. Hélinck, and E. Dugat-Bony. 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 1–11:362.
- Issenhuth-Jeanjean, S., P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, S. Nair, P.I. Fields, and F.-X. Weill. 2014. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 165:526–530. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.004.
- Ito, A., Y. Sato, S. Kudo, S. Sato, H. Nakajima, and T. Toba. 2003. The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Curr Microbiol* 47:0231–0236. doi:10.1007/s00284-002-3993-1.

J

- Jackson, H., and L.F.L. Clegg. 1966. The Microflora of Raw Bulk Tank Milk. *Can. J. Microbiol.* 12:429–432. doi:10.1139/m66-063.
- Janssen, A.M., J.J.C. Scheffer, and A.B. Svendsen. 1987. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods. *Planta Med* 53:395–398. doi:10.1055/s-2006-962755.
- Jeantet, R., and T. Croguennec. 2018. In *Le fromage, 4ème édition - Chapitre 4 : Du lait au fromage, aspects biochimiques* p77-134.
- Jenness, Robert. 1974. Biosynthesis and Composition of Milk. *Journal of Investigative Dermatology* 63:109–118. doi:10.1111/1523-1747.ep12678111.
- Johke, T. 1963. Acid-Soluble Nucleotides of Colostrum, Milk, and Mammary Gland. *The Journal of Biochemistry* 54:388–397.
- Johke, T., and T. Goto. 1962. Acid-Soluble Nucleotides in Cow's and Goat's Milk. *Journal of Dairy Science* 45:735–741. doi:10.3168/jds.S0022-0302(62)89480-6.
- Jollivet, N., M.-C. Bézenger, 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.
- Jones, P.W., P. Collins, G.T.H. Brown, and M. Aitken. 1982. Transmission of *Salmonella* Mbandaka to cattle from contaminated feed. *Epidemiology & Infection* 88:255–263. doi:10.1017/S002217240007011X.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops, and M. Wagner. 1998. Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and Nitrospira-Like Bacteria as Dominant Populations. *Appl Environ Microbiol* 64:3042–3051.

K

- Kagkli, D.M., M. Vancanneyt, C. Hill, P. Vandamme, and T.M. Cogan. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* 114:243–251. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.016.
- Kaletta, T., and M.O. Hengartner. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* 5:387–399. doi:10.1038/nrd2031.
- Kane, M.D., L.K. Poulsen, and D.A. Stahl. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:682–686.

- Karimi, R., S. Sohrabvandi, and A.M. Mortazavian. 2012. Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11:437–452. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00194.x.
- Keersmaecker, S.C.J., T.L.A. Verhoeven, J. Desair, K. Marchal, J. Vanderleyden, and I. Nagy. 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:89–96. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x.
- Kieronczyk, A., S. Skeie, T. Langsrud, and M. Yvon. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and Nonstarter Lactobacilli in the Formation of Cheese Aroma from Amino Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:734–739. doi:10.1128/AEM.69.2.734-739.2003.
- Kim, T., S. Cho, S.-M. Lee, H.M. Woo, J. Lee, Y. Um, and J.-H. Seo. 2016. High Production of 2,3-Butanediol (2,3-BD) by *Raoultella ornithinolytica* B6 via Optimizing Fermentation Conditions and Overexpressing 2,3-BD Synthesis Genes. *PLOS ONE* 11:e0165076. doi:10.1371/journal.pone.0165076.
- Kirk, J.H., C.A. Holmberg, and J.S. Jeffrey. 2002. Prevalence of *Salmonella* spp in selected birds captured on California dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:359–362. doi:10.2460/javma.2002.220.359.
- Klijn, N., A.H. Weerkamp, and W.M. de Vos. 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems.. *Appl Environ Microbiol* 61:788–792.
- Kobata, A. 1963. The Acid-Souble Nucleotides of Milk. *The Journal of Biochemistry* 53:167–175.
- Kon, S.K. 1951. Teneur en vitamines du lait : les variations et leurs causes. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* 5:211–227.
- Korhonen, H.J. 2009. Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications. *Australian Journal of Dairy Technology* 64:16–25.
- Kumar, A., and D. Nandi. 2007. Characterization and role of Peptidase N from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353:706–712. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.073.

L

- Lahtinen, S., A.C. Ouwehand, S. Salminen, and A. von Wright. 2011. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fourth Edition. CRC Press, New York. 780 pages.
- Lailier, R., M. Sanaa, J. Chadoeuf, B. Fontez, A. Brisabois, C. Colmin, and Y. Millemann. 2005. Prevalence of multidrug resistant (MDR) *Salmonella* in bovine dairy herds in western France. *Preventive Veterinary Medicine* 70:177–189. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.03.006.

- Larpin-Laborde, S., M. Imran, C. Bonaïti, N. Bora, Gelsomino, S. Goerges, F. Irlinger, M. Goodfellow, W. C. M. Vancanneyt, J. Swings, S. Scherer, M. Guéguen, and N. Desmasures. 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology*. doi:10.1139/w11-050.
- Lavoie, K., M. Touchette, D. St-Gelais, and S. Labrie. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci Technol* 92:455–468. doi:10.1007/s13594-011-0051-4.
- Le Minor, L. 1992. Taxonomie et nomenclature des *Salmonella*. *Médecine et maladies infectieuses* 22:246–248.
- Le Minor, L., M. Véron, and M. Popoff. 1982. The taxonomy of *Salmonella*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 133:223–243.
- Leclercq-Perlat, M.-N., G. Corrieu, and H.-E. Spinnler. 2004. The Color of *Brevibacterium linens* Depends on the Yeast Used for Cheese Deacidification. *Journal of Dairy Science* 87:1536–1544. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73305-6.
- Leclercq-Perlat, M.-N., and H.-E. Spinnler. 2010. The type of cheese curds determined the colouring capacity of *Brevibacterium* and *Arthrobacter* species. *Journal of Dairy Research* 77:287–294. doi:10.1017/S0022029910000245.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181–186. doi:10.1016/S0168-1605(00)00161-6.
- Lenoir, J. 1963. La flore microbienne du camembert et son évolution au cours de la maturation. *Le Lait* 43:262–270.
- Lerma, L.L., N. Benomar, M. del C.C. Muñoz, A. Gálvez, and H. Abriouel. 2014. Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic *Pseudomonas* spp. Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:6792–6806. doi:10.1128/AEM.01998-14.
- Leroy, F., and L. De Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67–78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- Leyva Salas, M., J. Mounier, F. Valence, M. Coton, A. Thierry, and E. Coton. 2017. Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* 5:37. doi:10.3390/microorganisms5030037.
- Li, H., H. Wang, J.-Y. D'Aoust, and J. Maurer. 2014. *Salmonella* Species. John Wiley & Sons, Ltd.
- Li, N., Y. Wang, C. You, J. Ren, W. Chen, H. Zheng, and Z. Liu. 2018. Variation in Raw Milk

- Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Scientific Reports* 8:1–10. doi:10.1038/s41598-018-20862-8.
- Lin, W.-C., C.P. Ptak, C.-Y. Chang, M.-K. Ian, M.-Y. Chia, T.-H. Chen, and C.-J. Kuo. 2020. Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated From Dairy Cow Feces Exhibiting Promising Probiotic Properties and in vitro Antibacterial Activity Against Foodborne Pathogens in Cattle. *Front. Vet. Sci.* 7. doi:10.3389/fvets.2020.00239.
- Liu, W., H. Pang, H. Zhang, and Y. Cai. 2014. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. H. Zhang and Y. Cai, ed. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Loh, J.M., N. Adenwalla, S. Wiles, and T. Proft. 2013. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 4:419–428. doi:10.4161/viru.24930.

M

- Madec, M., S. Mejean, and J. Maubois. 1992. Retention of *Listeria* and *Salmonella* cells contaminating skim milk by tangential membrane microfiltration ("Bactocatch" process). *Le Lait* 72:327–332.
- Madera, C., P. García, A. Rodríguez, J.E. Suárez, and B. Martínez. 2009. Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972. *International Journal of Food Microbiology* 129:99–102. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.004.
- Magnusson, J., K. Ström, S. Roos, J. Sjögren, and J. Schnürer. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219:129–135. doi:10.1016/S0378-1097(02)01207-7.
- Makras, L., V. Triantafyllou, D. Fayol-Messaoudi, T. Adriany, G. Zoumpopoulou, E. Tsakalidou, A. Servin, and L. De Vuyst. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology* 157:241–247. doi:10.1016/j.resmic.2005.09.002.
- Mallet, A. 2012. Diversité microbienne des laits crus : états des lieux, réservoirs et expression en transformation fromagère : exemple de Camembert de Normandie. Thèse. Université de Caen. 228 pages,.
- Mallet, A., M. Guéguen, F. Kauffmann, C. Chesneau, A. Sesboué, and N. Desmasures. 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27:13–21. doi:10.1016/j.idairyj.2012.07.009.
- Mansour, S., J.M. Beckerich, and P. Bonnarme. 2008. Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6505–6512.

doi:10.1128/AEM.01519-08.

Marshall, K.C., and M. Alexander. 1960. Competition between soil bacteria and *fusarium*. *Plant Soil* 12:143–153. doi:10.1007/BF01377367.

Martel, J.L. 1985. L'infection salmonellique des bovins. *Epidémiologie Santé Anim.* Vol. 7:71–80.

Matevosyan, L., I. Bazukyan, and A. Trchounian. 2019a. Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC Microbiology* 19:102. doi:10.1186/s12866-019-1475-x.

Matevosyan, L., I. Bazukyan, and A. Trchounian. 2019b. Comparative analysis of the effect of Ca and Mg ions on antibacterial activity of lactic acid bacteria isolates and their associations depending on cultivation conditions. *AMB Express* 9. doi:10.1186/s13568-019-0758-9.

Mauch, A., F. Dal Bello, A. Coffey, and E.K. Arendt. 2010. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International Journal of Food Microbiology* 141:116–121. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.002.

Mayoral, M.B., R. Martín, A. Sanz, P.E. Hernández, I. González, and T. García. 2005. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International Journal of Food Microbiology* 105:27–34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.006.

McDonough, P.L., S.J. Shin, and D.H. Lein. 2000. Diagnostic and Public Health Dilemma of Lactose-Fermenting *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in Cattle in the Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1221–1226. doi:10.1128/JCM.38.3.1221-1226.2000.

McGuirk, S.M., and S. Peek. 2003. Salmonellosis in cattle: a review. Page in American Association of Bovine Practitioners 36th Annual Conference.

McLaren, I.M., and C. Wray. 1991. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* infection in calves: persistence of salmonellae on calf units. *Vet. Rec.* 129:461–462. doi:10.1136/vr.129.21.461.

Medhanie, G.A., D.L. Pearl, S.A. McEwen, M.T. Guerin, C.M. Jardine, J. Schrock, and J.T. LeJeune. 2014. A longitudinal study of feed contamination by European starling excreta in Ohio dairy farms (2007–2008). *Journal of Dairy Science* 97:5230–5238. doi:10.3168/jds.2014-8045.

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* 121:157–168. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.010.

Mesina, J.E., and R.S.F. Campbell. 1975. Wild rodents in the transmission of disease to Animals and Man. *Vet. Bull.*, 5, 2, 87-95.

Michel, V., A. Hauwuy, and J.-F. Chamba. 2001. La flore microbienne de laits crus de vache :

- diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81:575–592. doi:10.1051/lait:2001151.
- Milliere, J.B. (Ecole N.S.A. et des I.A., and G. Lefebvre. 1994. *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheeses from cow's raw milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* (Netherlands) 48:p 19-30.
- Modi, R., Y. Hirvi, A. Hill, and M.W. Griffiths. 2001. Effect of Phage on Survival of *Salmonella Enteritidis* during Manufacture and Storage of Cheddar Cheese Made from Raw and Pasteurized Milk. *J Food Prot* 64:927–933. doi:10.4315/0362-028X-64.7.927.
- Molimard, P. 1995. Growth of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* in pure and mixed cultures on experimental mold ripened cheese of Camembert-type.. *Le Lait* 75:3–16.
- Monnet, C., A. Back, and F. Irlinger. 2012. Growth of Aerobic Ripening Bacteria at the Cheese Surface Is Limited by the Availability of Iron. *Appl Environ Microbiol* 78:3185–3192. doi:10.1128/AEM.00085-12.
- Monsallier, F., C. Couzy, C. Chatelard-Chauvin, Y. Bouton, F. Feutry, I. Verdier-Metz, S. Hulin, and M.-C. Montel. 2016. Accompagner les producteurs laitiers pour orienter les équilibres microbiens des laits en faveur de la qualité des fromages au lait cru. *Innovations Agronomiques* 49:267–279. doi:10.15454/1.4622824699028472E12.
- Montel, M.-C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D.A. Vuitton, N. Desmasures, and F. Berthier. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177:136–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.
- Montesinos, E., and A. Bonaterra. 2009. Pesticides, in : *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press. p. 110-120. Oxford, UK.
- Morales-Estrada, A.I., A. Lopez-Merino, N. Gutierrez-Mendez, E.A. Ruiz, and A. Contreras-Rodriguez. 2016. Partial Characterization of Bacteriocin Produced by Halotolerant *Pediococcus acidilactici* Strain QC38 Isolated from Traditional Cotija Cheese. *Pol. J. Microbiol.* 65:279–285. doi:10.5604/17331331.1215607.
- Morrissey, R., C. Hill, and M. Begley. 2013. Shining light on food microbiology; applications of Lux-tagged microorganisms in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 32:4–15. doi:10.1016/j.tifs.2013.05.001.
- 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* 133:31–37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.020.
- Mufandaedza, J., B.C. Viljoen, S.B. Feresu, and T.H. Gadaga. 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against

pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 108:147–152. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.005.

Mullan, W.M.A. 2003. Major antimicrobial proteins in milk. Available: <http://www.dairyscience.info/exploitation-of-anti-microbial-proteins/52-antimicrobial-proteins.html>.

Muñoz, A., S. Ananou, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, A. Rodríguez, M. Maqueda, and E. Valdivia. 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal* 17:760–769. doi:10.1016/j.idairyj.2006.09.006.

Muñoz, A., M. Maqueda, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, A. Rodríguez, and E. Valdivia. 2004. Biocontrol of Psychrotrophic Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a Nonfat Hard Cheese by an Enterococcal Strain–Producing Enterocin AS-48. *J Food Prot* 67:1517–1521. doi:10.4315/0362-028X-67.7.1517.

N

Nero, L.A., M.R.D. Mattos, M.D.A.F. Barros, M.B.T. Ortolani, V. Beloti, and B.D.G.D.M. Franco. 2008. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Raw Milk Produced in Brazil: Occurrence and Interference of Indigenous Microbiota in their Isolation and Development. *Zoonoses and Public Health* 55:299–305. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01130.x.

Nielsen, L.R. 2013. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella Dublin* in cattle. *Veterinary Microbiology* 162:1–9. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.003.

Nielsen, L.R., Y.H. Schukken, Y.T. Gröhn, and A.K. Ersbøll. 2004. *Salmonella Dublin* infection in dairy cattle: risk factors for becoming a carrier. *Preventive Veterinary Medicine* 65:47–62. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.06.010.

Nilsson, L., L. Gram, and H.H. Huss. 1999. Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon Using a Competitive Lactic Acid Bacteria Flora. *Journal of Food Protection* 62:336–342. doi:10.4315/0362-028X-62.4.336.

Nilsson, L., T.B. Hansen, P. Garrido, C. Buchrieser, P. Glaser, S. Knøchel, L. Gram, and A. Gravesen. 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98:172–183. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02438.x.

Nissen-Meyer, J., H. Holo, L.S. Håvarstein, K. Sletten, and I.F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides.. *Journal of Bacteriology* 174:5686–5692. doi:10.1128/jb.174.17.5686-5692.1992.

O

- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267:5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- OMS. 2018. Infections à *Salmonella* (non typhiques). Accessed. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
- Ong, S.A., and J.B. Neilands. 1979. Siderophores in microbially processed cheese. *J. Agric. Food Chem.* 27:990–995. doi:10.1021/jf60225a033.
- Ortiz-Rivera, Y., R. Sánchez-Vega, N. Gutiérrez-Méndez, J. León-Félix, C. Acosta-Muñiz, and D.R. Sepulveda. 2017. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 100:4258–4268. doi:10.3168/jds.2016-11534.
- Oscáriz, J.C., and A.G. Pisabarro. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int Microbiol* 4:13–19. doi:10.1007/s101230100003.

P

- Pal, K.K., and B. McSpadden Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens *The Plant Health Instructor*:25. doi:DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Paris Normandie. 2017. Les bactéries d'un camembert normand examinées par le Conseil d'État.
- Park, T. 1954. Experimental Studies of Interspecies Competition II. Temperature, Humidity, and Competition in Two Species of *Tribolium*. *Physiological Zoology* 27:177–238. doi:10.1086/physzool.27.3.30152164.
- Park, Y.W., and G.F.W. Haenlein. 2013. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. John Wiley & Sons, London, 1275 pages.
- Park, Y.W., M. Juárez, M. Ramos, and G.F.W. Haenlein. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:88–113. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.
- Parmanand, B.A., L. Kellingray, G. Le Gall, A.W. Basit, S. Fairweather-Tait, and A. Narbad. 2019. A decrease in iron availability to human gut microbiome reduces the growth of potentially pathogenic gut bacteria; an in vitro colonic fermentation study. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 67:20–27. doi:10.1016/j.jnutbio.2019.01.010.
- Perea Vélez, M., K. Hermans, T.L.A. Verhoeven, S.E. Lebeer, J. Vanderleyden, and S.C.J. De Keersmaecker. 2007. Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Columbian dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 103:666–674. doi:10.1111/j.1365-

2672.2007.03294.x.

Perrin, D.D., B. Dempsey, and E.P. Serjeant. 1981. PKa Prediction for Organic Acids and Bases. Springer Netherlands, 146 pages, Dordrecht.

Popoff, M.Y., J. Bockemühl, and L.L. Gheesling. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology* 155:568–570. doi:10.1016/j.resmic.2004.04.005.

Poupée, B. 2016. Maitrise de la Salmonellose en élevage bovin laitier : Evaluation de mesures de gestion sanitaire, d'une vaccination et de l'ajout de pré- pro- biotiques dans la ration. Thèse vétérinaire. Faculté de médecine de Nantes. 146 pages,.

Q

Quigley, L., O. O'Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2012. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5717–5723. doi:10.1128/AEM.00918-12.

Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37:664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030.

R

Rasolofo, E.A., D. St-Gelais, G. LaPointe, and D. Roy. 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* 138:108–118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.008.

Rattanachaikunsopon, P., and P. Phumkhachorn. 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production.. *Annals of Biological Research* 1:218–228.

Rattray, F.P., and P.F. Fox. 1999. Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of *Brevibacterium linens* Relevant to Cheese Ripening: A Review1. *Journal of Dairy Science* 82:891–909. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75308-7.

Reeves, M.W., G.M. Evins, A.A. Heiba, B.D. Plikaytis, and J.J. Farmer. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov.. *Journal of Clinical Microbiology* 27:313–320.

Remeuf, F., and L. Vassal. 1991. Polymorphisme des lactoprotéines caprines et incidence sur les aptitudes fromagères des laits. *Journées Scientifiques*.

Renner, E. 1983. Milk and dairy products in human nutrition.. *Milk and dairy products in human nutrition*. VV-GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag, Munich:450.

- Renner, E., G. Schaafsma, and K.J. Scott. 1989. Micronutrients in Milk. Accessed May 7, 2020. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9010086>.
- Reuben, R.C., P.C. Roy, S.L. Sarkar, A.S.M. Rubayet Ul Alam, and I.K. Jahid. 2020. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science* 103:1223–1237. doi:10.3168/jds.2019-17092.
- Ricciardi, A., A. Guidone, R.G. Ianniello, S. Cioffi, M. Aponte, D. Pavlidis, E. Tsakalidou, T. Zotta, and E. Parente. 2015. A survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: Culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit. *International Dairy Journal* 43:42–50. doi:10.1016/j.idairyj.2014.11.006.
- Richard, J., and C. Houssu. 1983. Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués. *Lait* 63:148–170. doi:10.1051/lait:1983625-62612.
- Riedel, C.U., I.R. Monk, P.G. Casey, D. Morrissey, G.C. O’Sullivan, M. Tangney, C. Hill, and C.G.M. Gahan. 2007. Improved Luciferase Tagging System for *Listeria monocytogenes* Allows Real-Time Monitoring In Vivo and In Vitro. *Appl Environ Microbiol* 73:3091–3094. doi:10.1128/AEM.02940-06.
- Rodrigues, L.R. 2013. Milk and Dairy Products in Human Nutrition - Milk Minor Constituents, Enzymes, Hormones, Growth Factors, and Organic Acids. In *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. West Sussex, UK: John Wiley and Sons. 220-245.
- Rodríguez, E., J.L. Arqués, R. Rodríguez, M. Nuñez, and M. Medina. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Letters in Applied Microbiology* 37:259–263. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01390.x.
- Rodríguez, J.M., M.I. Martínez, and J. Kok. 2002. Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:91–121. doi:10.1080/10408690290825475.
- Rogers, L.A., and E.O. Whittier. 1928. Limiting factor in the lactic fermentation. *J Bacteriol* 16:211–229.
- Ross, R.P., S. Morgan, and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology* 79:3–16.
- Rouxel, M. 2019. Biopréservation de matrices lactées par des ferments bactériens. Thèse, Université de Poitiers, 284 pages,.
- Ruzante, J.M., J.E. Lombard, B. Wagner, C.P. Fossler, J.S. Karns, J.A.S.V. Kessel, and I.A. Gardner. 2010. Factors Associated with *Salmonella* Presence in Environmental Samples and Bulk Tank Milk from US Dairies. *Zoonoses and Public Health* 57:e217–e225. doi:10.1111/j.1863-

2378.2010.01333.x.

S

- Santarelli, M., B. Bottari, C. Lazzi, E. Neviani, and M. Gatti. 2013. Survey on the community and dynamics of lactic acid bacteria in Grana Padano cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 36:593–600. doi:10.1016/j.syapm.2013.04.007.
- Sarker, S.D., L. Nahar, and Y. Kumarasamy. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42:321–324. doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006.
- Schelcher, F., and J. Valarcher. 1997. Physiopathologie des salmonelloses bovines. *Bulletin des GTV*.
- Shelobolina, E.S., S.A. Sullivan, K.R. O'Neill, K.P. Nevin, and D.R. Lovley. 2004. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2959–2965. doi:10.1128/AEM.70.5.2959-2965.2004.
- Smajhel, S., and N. Shadrova. 2019. Analysis of *Salmonella* spp. detections in European union countries according to RASFF database. *Veterinary Science Today* 12–20. doi:10.29326/2304-196X-2018-4-27-12-20.
- Solieri, L., A. Bianchi, and P. Giudici. 2012. Inventory of non starter lactic acid bacteria from ripened Parmigiano Reggiano cheese as assessed by a culture dependent multiphasic approach. *Systematic and Applied Microbiology* 35:270–277. doi:10.1016/j.syapm.2012.04.002.
- Stephens, T.P., G.H. Loneragan, E. Karunasena, and M.M. Brashears. 2007. Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. *J. Food Prot.* 70:2386–2391. doi:10.4315/0362-028x-70.10.2386.
- Stergiou, V.A., L.V. Thomas, and M.R. Adams. 2006. Interactions of Nisin with Glutathione in a Model Protein System and Meat. *J Food Prot* 69:951–956. doi:10.4315/0362-028X-69.4.951.
- Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes, and T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3613–3615.
- Stevenson, M.A., P.L. Morgan, J. Sanhueza, G.E. Oakley, R.S. Bateman, A. McFADDEN, N. MacPHERSON, K.L. Owen, L. Burton, S. Walsh, J. Weston, and R. Marchant. 2016. A case-control study to identify risk factors for acute salmonellosis in New Zealand dairy herds, 2011–2012. *Epidemiology & Infection* 144:2154–2164. doi:10.1017/S095026881600042X.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:331–345.

doi:10.1007/BF00395940.

Streitenberger, S., J. López-Mas, A. Sánchez-Ferrer, and F. García-Carmona. 2001. Highly efficient *Aerococcus viridans* L- α -glycerophosphate oxidase production in the presence of H₂O₂-decomposing agent: purification and kinetic characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:329–333. doi:10.1007/s002530100664.

Stucky, B.J. 2012. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. *J Biomol Tech* 23:90–93. doi:10.7171/jbt.12-2303-004.

Sugawara, M., N. Sato, T. Nakano, T. Idota, and I. Nakajima. 1995. Profile of Nucleotides and Nucleosides of Human Milk. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 41:409–418. doi:10.3177/jnsv.41.409.

Suzuki, K., and G. Sakaguchi. 1955. The nutritional requirements of the genus *Salmonella*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 8:33–38. doi:10.7883/yoken1952.8.33.

Svetoch, E.A., B.V. Eruslanov, V.P. Levchuk, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, J. Stepanshin, I. Dyatlov, B.S. Seal, and N.J. Stern. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and Characterization of Its Bacteriocin, Including the Antimicrobial Activity Spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2749–2754. doi:10.1128/AEM.02481-10.

T

Taale, E., A. Savadogo, C. Zongo, F. Tapsoba, S.D. Karou, and A.S. Traore. 2016. Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 10:384–399. doi:10.4314/ijbcs.v10i1.29.

Tabe, E.S., J. Oloya, D.K. Doetkott, M.L. Bauer, P.S. Gibbs, and M.L. Khaitisa. 2008. Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *J. Food Prot.* 71:539–544. doi:10.4315/0362-028x-71.3.539.

Tablante, N.L., and V.M. Lane. 1989. Wild mice as potential reservoirs of *Salmonella* Dublin in a closed dairy herd. *Can. Vet. J.* 30:590–592.

The European Committee. 2020. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

Tsai, C.J.-Y., J.M.S. Loh, and T. Proft. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7:214–229. doi:10.1080/21505594.2015.1135289.

V

- Vacheyrou, M., A.-C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux, and Y. Bouton. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* 146:253–262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033.
- Vachon, J.F., E.E. Kheadr, J. Giasson, P. Paquin, and I. Fliss. 2002. Inactivation of Foodborne Pathogens in Milk Using Dynamic High Pressure. *J Food Prot* 65:345–352. doi:10.4315/0362-028X-65.2.345.
- Vance, R.R. 1984. Interference Competition and the Coexistence of Two Competitors on a Single Limiting Resource. *Ecology* 65:1349–1357. doi:10.2307/1939115.
- Vassal, L., V. Monnet, D.L. Bars, C. Roux, and J.C. Gripon. 1986. Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type Camembert. *Lait* 66:341–351. doi:10.1051/lait:1986422.
- Vignaud, M., Cherchame, and Marault. 2017. MLVA for *Salmonella Enterica* Subsp. Enterica Serovar Dublin: Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012. Accessed April 20, 2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00295/full>.
- Vignolo, G., S. Fadda, M.N. de Kairuz, A.A.P. de Ruiz Holgado, and G. Oliver. 1996. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by ‘Lactocin 705’, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology* 29:397–402. doi:10.1016/0168-1605(95)00038-0.
- Vignon, B., F. Laurent, and M. JOURNET. 1978. Variations de la teneur en azote non protéique et en urée du lait à la mise à l’herbe des vaches laitières. *Annales de zootechnie* 27:303–315.
- Villegas, E., and S.E. Gilliland. 1998. Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science* 63:1070–1074. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb15857.x.
- Visca, P., E. Filetici, M. p. Anastasio, C. Vetriani, M. Fantasia, and N. Orsi. 1991. Siderophore production by *Salmonella* species isolated from different sources. *FEMS Microbiology Letters* 79:225–232. doi:10.1111/j.1574-6968.1991.tb04533.x.

W

- Walstra, P., and R. Jenness. 1984. *Dairy chemistry and physics* John Wiley&Sons, New York.
- Walter, V., C. Syldatk, and R. Hausmann. 2010. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. R. Sen, ed. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY.

- Wang Lu, Manson JoAnn E., Buring Julie E., Lee I-Min, and Sesso Howard D. 2008. Dietary Intake of Dairy Products, Calcium, and Vitamin D and the Risk of Hypertension in Middle-Aged and Older Women. *Hypertension* 51:1073–1079. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107821.
- Wathes, C.M., W.A. Zaidan, G.R. Pearson, M. Hinton, and N. Todd. 1988. Aerosol infection of calves and mice with *Salmonella typhimurium*. *Vet. Rec.* 123:590–594.
- Wechsler, D., B. Walther, E. Jakob, and H. Winkler. 2009. Importance des amines biogènes dans l'alimentation et présence dans les différents fromages.. *APL forum* 1–25.
- Whitman, W.B. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes* Springer 3th edition:155.
- Widden, P. 1994. Competition and the fungal community. *Environmental and Microbiological The mycota IV*:135–147.
- Willey, J.M., and W.A. van der Donk. 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology* 61:477–501. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093501.
- Wilson, K.H., and F. Perini. 1988. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora.. *Infect Immun* 56:2610–2614.
- Woraprayote, W., L. Pumpuang, A. Tosukhowong, S. Roytrakul, R.H. Perez, T. Zendo, K. Sonomoto, S. Benjakul, and W. Visessanguan. 2015. Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control* 55:176–184. doi:10.1016/j.foodcont.2015.02.036.
- Worobo, R.W., T. Henkel, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas, and M.E. Stiles. 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140:517–526. doi:10.1099/00221287-140-3-517.
- Wu, A., S. Bai, X. Ding, J. Wang, Q. Zeng, H. Peng, B. Wu, and K. Zhang. 2020. The Systemic Zinc Homeostasis Was Modulated in Broilers Challenged by *Salmonella*. *Biol Trace Elem Res* 196:243–251. doi:10.1007/s12011-019-01921-1.
- Wu, H., Q.D. Nguyen, T.T.M. Tran, M.T. Tang, T. Tsuruta, and N. Nishino. 2019. Rumen fluid, feces, milk, water, feed, airborne dust, and bedding microbiota in dairy farms managed by automatic milking systems. *Animal Science Journal* 90:445–452. doi:10.1111/asj.13175.
- Yang, Y., J.D. Latorre, B. Khatri, Y.M. Kwon, B.W. Kong, K.D. Teague, L.E. Graham, A.D. Wolfenden, B.D. Mahaffey, M. Baxter, X. Hernandez-Velasco, R. Merino-Guzman, B.M. Hargis, and G. Tellez. 2018. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria candidates for intestinal epithelial permeability and *Salmonella Typhimurium* colonization in neonatal turkey poults. *Poultry Science* 97:515–521. doi:10.3382/ps/pex311.

- Yanze Kontchou, C., and R. Blondeau. 1990. Isolation and characterization of hydrogen peroxide producing *Aerococcus* sp. from soil samples. *FEMS Microbiology Letters* 68:323–328. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb13959.x.
- Yin, F., A. Farzan, Q.C. Wang, H. Yu, Y. Yin, Y. Hou, R. Friendship, and J. Gong. 2014. Reduction of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 infection in experimentally challenged weaned pigs fed a *Lactobacillus*-fermented feed. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:628–634. doi:10.1089/fpd.2013.1676.
- Yılmaz, C., and V. Gökmen. 2017. Formation of tyramine in yoghurt during fermentation – Interaction between yoghurt starter bacteria and *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International* 97:288–295. doi:10.1016/j.foodres.2017.04.014.
- Yoneyama, F., Y. Imura, K. Ohno, T. Zendo, J. Nakayama, K. Matsuzaki, and K. Sonomoto. 2009. Peptide-Lipid Huge Toroidal Pore, a New Antimicrobial Mechanism Mediated by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:3211–3217. doi:10.1128/AAC.00209-09.

Z

-
- Zacharof, M.P., and R.W. Lovitt. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* 2:50–56. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010.
- Zagorec, M., S. Christieans, and H.E. Spinnler. 2013. Flores protectrices pour la conservation des aliments - Chapitre 7. Ed. Quae, Versailles, 163 pages.
- Zamfir, M., R. Callewaert, P.C. Cornea, L. Savu, I. Vatafu, and L.D. Vuyst. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology* 87:923–931. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00950.x.
- Zhang, H., G.Q. Qian, and L.I. Bin. 2016. Study of *Lactobacillus* strains with antagonistic activity against *Salmonella*. *Food Research and Development*.
- Zheng, J., S. Wittouck, E. Salvetti, C.M.A.P. Franz, H.M.B. Harris, P. Mattarelli, P.W. O’Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G.E. Felis, M.G. Gänzle, and S. Lebeer. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70:2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107.
- Zycka-Krzesinska, J., J. Boguslawska, T. Aleksandrak-Piekarczyk, J. Jopek, and J.K. Bardowski. 2015. Identification and characterization of tetracycline resistance in *Lactococcus lactis* isolated from Polish raw milk and fermented artisanal products. *International Journal of Food Microbiology*

211:134–141. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.009.

ANNEXES

ANNEXES

Ancienne classification	Nouvelle classification
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
<i>Lactobacillu brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>

Annexe 1 : Correspondance entre l'ancienne classification des lactobacilles et la nouvelle classification

Identification		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Candida anglica</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Salmonella</i>	UCMA	9110	4132	7340	11417	12716	4935	5042	3066	6472	1676	1068	6360	21104	1495
Mbandaka	19835	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	19837	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	19842	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	19851	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
	19892	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
	19906	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	19909	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	19917	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	17913	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	20264	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Montevideo	19832	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	19834	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	19840	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
	19867	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	19870	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	19876	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	19889	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	19904	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
	20260	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	20266	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Ohio	19862	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
	19886	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Panama	17917	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	17925	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Anatum	17921	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Typhimurium	19933	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 2 : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu lait par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
<i>Salmonella</i>	UCMA	8483	8501	18022	1049	5744	13205	1044	1053	1151	1594	4512	9863	4441	4459
Mbandaka	19835	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	19837	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
	19842	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	19851	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	19892	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	19906	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
	19909	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	19917	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	17913	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20264	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Montevideo	19832	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	19834	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	19840	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	19867	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	19870	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	19876	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19889	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19904	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	20260	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	20266	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ohio	19862	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	19886	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Panama	17917	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	17925	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anatum	17921	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Typhimurium	19933	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 2 (suite) : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu lait par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	<i>Weissella hellenica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aerococcus urinaequei</i>
<i>Salmonella</i>	UCMA	4460	7402	3915	12627	4514	21107	21105	4515	11210	4546	21106	21108	4571	5972
Mbandaka	19835	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	19837	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	19842	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
	19851	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
	19892	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	19906	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	19909	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
	19917	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	17913	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	20264	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Montevideo	19832	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	19834	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	19840	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	19867	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
	19870	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
	19876	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	19889	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	19904	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	20260	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	20266	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Ohio	19862	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	19886	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Panama	17917	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	17925	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Anatum	17921	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Typhimurium	19933	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 2 (suite) : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu lait par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Aerococcus urinaeequi</i>						
<i>Salmonella</i>	UCMA	6078	6731	6761	18010	18036	18039	18046
Mbandaka	19835	+	-	-	-	+	+	-
	19837	+	-	-	+	+	+	-
	19842	+	-	-	-	+	+	-
	19851	+	+	-	+	+	+	+
	19892	-	-	-	-	+	+	+
	19906	+	+	-	+	+	-	-
	19909	-	-	+	+	-	-	-
	19917	+	+	+	+	+	-	-
	17913	+	-	-	-	+	+	+
	20264	+	-	-	+	+	+	-
Montevideo	19832	+	+	+	+	+	+	-
	19834	+	-	-	+	+	+	-
	19840	+	+	+	-	+	+	+
	19867	-	-	-	+	+	+	+
	19870	+	-	-	+	+	+	+
	19876	+	-	-	-	-	+	+
	19889	+	+	+	+	+	+	-
	19904	+	-	+	+	+	+	+
	20260	+	+	-	+	+	+	+
	20266	+	+	-	+	+	+	+
Ohio	19862	+	-	+	+	+	+	+
	19886	+	+	+	+	+	+	+
Panama	17917	+	-	-	+	+	+	-
	17925	+	-	+	-	+	+	-
Anatum	17921	-	-	-	-	-	+	+
Typhimurium	19933	+	-	-	+	+	+	-

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 2 (suite) : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu lait par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Candida anglica</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Salmonella</i>	UCMA	9110	4132	7340	11417	12716	4935	5042	3066	6472	1676	1068	6360	21104	1495
Mbandaka	19835	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	19837	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	19842	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
	19851	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	19892	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	19906	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	19909	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
	19917	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
	17913	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
	20264	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Montevideo	19832	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19834	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	19840	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
	19867	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
	19870	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	19876	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
	19889	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
	19904	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
	20260	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	20266	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ohio	19862	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	19886	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Panama	17917	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	17925	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Anatum	17921	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Typhimurium	19933	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 3 : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu fromage par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
<i>Salmonella</i>	UCMA	8483	8501	18022	1049	5744	13205	1044	1053	1151	1594	4512	9863	4441	4459
Mbandaka	19835	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	19837	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	19842	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	19851	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	19892	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19906	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	19909	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	19917	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	17913	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	20264	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Montevideo	19832	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	19834	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	19840	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19867	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	19870	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	19876	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	19889	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	19904	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	20260	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	20266	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Ohio	19862	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	19886	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Panama	17917	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	17925	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Anatum	17921	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Typhimurium	19933	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 3 (suite) : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu fromage par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	<i>Weissella hellenica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus galloyticus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Aerococcus urinaequei</i>
<i>Salmonella</i>	UCMA	4460	7402	3915	12627	4514	21107	21105	4515	11210	4546	21106	21108	4571	5972
Mbandaka	19835	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	19837	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	19842	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	19851	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
	19892	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	19906	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	19909	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
	19917	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	17913	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	20264	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Montevideo	19832	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	19834	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	19840	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
	19867	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	19870	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
	19876	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	19889	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	19904	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	20260	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	20266	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Ohio	19862	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	19886	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Panama	17917	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	17925	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Anatum	17921	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Typhimurium	19933	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 3 (suite) : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu fromage par la méthode de criblage 1

Identification		<i>Aerococcus urinaeequi</i>						
<i>Salmonella</i>	UCMA	6078	6731	6761	18010	18036	18039	18046
Mbandaka	19835	+	+	+	+	+	+	-
	19837	+	+	+	+	-	-	-
	19842	+	+	+	-	+	-	-
	19851	+	+	+	+	+	+	+
	19892	+	+	+	+	+	-	-
	19906	+	+	+	+	+	+	-
	19909	+	+	+	+	+	+	-
	19917	+	+	+	+	+	+	-
	17913	+	+	+	+	-	+	-
	20264	+	+	+	+	+	+	-
Montevideo	19832	+	+	+	+	+	-	+
	19834	+	+	+	+	+	-	+
	19840	+	-	+	+	+	-	+
	19867	-	+	+	+	-	-	+
	19870	+	-	-	+	+	+	+
	19876	+	+	+	+	+	+	+
	19889	+	+	+	-	+	+	+
	19904	+	+	+	-	+	+	+
	20260	+	+	+	+	+	+	+
	20266	+	+	+	+	+	+	+
Ohio	19862	+	+	+	+	+	+	+
	19886	+	+	+	+	+	+	+
Panama	17917	+	+	+	+	+	+	+
	17925	+	+	+	+	+	+	+
Anatum	17921	+	+	+	-	+	+	+
Typhimurium	19933	+	+	+	-	+	+	-

+ : activité inhibitrice, - : pas d'activité inhibitrice

Annexe 3 (suite) : Criblage de 49 isolats laitiers contre les 16 souches de *Salmonella* de terrain en milieu fromage par la méthode de criblage 1

Elément (mg/L)	Contrôle négatif	<i>S. Mbandaka</i> UCMA 19909	<i>S. Typhimurium</i> UCMA 12999
Antimoine	nd	nd	nd
Arsenic	nd	nd	nd
Béryllium	nd	nd	nd
Bore	0,38	0,3	0,24
Cadmium	nd	nd	nd
Calcium	1 402,421	994,146	816,568
Chrome	0,233	0,001	0,003
Cobalt	nd	nd	nd
Cuivre	0,048	0,033	0,027
Fer	1,345	0,115	0,099
Magnésium	128,844	92,596	75,228
Manganèse	0,051	0,023	0,020
Molybdène	0,100	0,050	0,040
Nickel	nd	nd	nd
Phosphore	1 210,7	844,400	669,400
Plomb	nd	nd	nd
Potassium	1 372,374	1 182,702	1 003,052
Sélénium	0,052	0,038	0,027
Soufre	421,9	290,9	234,1
Vanadium	0,001	0,001	0,001
Zinc	7,399	3,403	2,895

Annexe 4 : Quantification par analyse ICP-MS des différents éléments chimiques captés dans le surnageant de culture de *Salmonella* UCMA 19909 et UCMA 12999 après culture en lait écrémé reconstitué

Criblage 1		Antibiotique : MIC concentration (µg/mL)										
UCMA	Genre	Amikacine	Ampicilline	Ceftazidime	Chloramphenicol	Ciprofloxacine	Erythromycine	Gentamicine	Lévofloxacine	Penicilline G	Tetracycline	Vancomycine
5972		nd	0,94	nd	nd	0,19	nd	nd	0,75	0,75	0,125	1
18036		nd	1	nd	nd	0,19	nd	nd	0,75	0,75	256	0,75
18039		nd	1	nd	nd	0,25	nd	nd	1	2	0,38	2
6078	<i>Aerococcus</i>	nd	0,125	nd	nd	0,125	nd	nd	0,5	8	0,125	0,38
6731		nd	0,5	nd	nd	0,25	nd	nd	2	0,5	0,125	0,75
6761		nd	0,38	nd	nd	0,5	nd	nd	4	0,25	0,25	0,75
18010		nd	0,125	nd	nd	0,5	nd	nd	1,5	0,38	256	0,5
4132	<i>Alcaligenes</i>	1,5	nd	2	nd	0,19	nd	0,25	nd	nd	nd	nd
6472		nd	0,125	nd	1,5	nd	0,125	0,28	nd	0,38	256	0,5
4571		nd	0,64	nd	1,5	nd	1,5	0,5	nd	0,19	0,25	0,5
9110		nd	0,125	nd	0,75	nd	0,094	0,75	nd	0,094	0,19	0,5
1068		nd	0,5	nd	1,5	nd	0,19	0,5	nd	0,25	0,25	0,75
6360		nd	0,25	nd	12	nd	0,38	0,38	nd	0,25	256	0,5
1495		nd	0,38	nd	0,5	nd	0,125	0,5	nd	0,125	0,25	0,75
8483		nd	0,38	nd	1	nd	0,125	0,5	nd	0,38	0,25	0,75
8501		nd	0,5	nd	2	nd	2	0,75	nd	0,38	256	0,5
18022		nd	0,125	nd	1,5	nd	0,25	0,75	nd	0,75	0,38	0,5
1049	<i>Lactococcus</i>	nd	0,38	nd	1,5	nd	0,19	0,38	nd	0,5	256	0,75
13205		nd	0,5	nd	1	nd	0,125	0,5	nd	0,25	256	0,75
1044		nd	0,25	nd	0,5	nd	0,125	0,5	nd	0,5	256	0,5
1053		nd	0,38	nd	1,5	nd	0,125	0,5	nd	0,38	0,5	0,75
1151		nd	0,38	nd	1	nd	0,125	0,38	nd	0,38	0,5	0,75
1594		nd	0,38	nd	1	nd	0,125	0,38	nd	0,38	0,5	0,75
9863		nd	0,94	nd	1	nd	0,125	0,25	nd	0,5	0,38	0,75
4441		nd	0,75	nd	1,5	nd	0,125	0,38	nd	0,25	1	256
L4		nd	0,75	nd	2	nd	0,38	1,5	nd	0,5	2	256
4512		nd	0,75	nd	1	nd	0,125	0,38	nd	0,38	0,25	256
1676	<i>Leuconostoc</i>	nd	nd	nd	1,5	0,75	0,19	3	nd	nd	0,19	nd
7402	<i>Pseudomonas</i>	0,5	nd	3	nd	0,047	nd	0,125	0,047	nd	nd	nd
3915	<i>Raoultella</i>	0,75	nd	nd	nd	0,023	nd	0,125	nd	nd	0,75	nd

Annexe 5 : Valeurs de la concentration minimale inhibitrice pour les isolats issus du criblage 1 contre les différents antibiotiques

Criblage 2		Antibiotique : MIC concentration (µg/mL)						
UCMA	Genre	Ampicilline	Chloramphenicol	Erythromycine	Gentamicine	Penicilline G	Tetracycline	Vancomycine
1043		0,38	1	0,125	0,5	0,38	256	0,75
1066		0,5	2	0,19	0,5	0,5	0,19	1
1067		0,38	1	0,125	0,75	0,5	0,19	0,75
1073		0,5	1,5	0,19	0,75	0,38	256	0,75
1076		0,5	1,5	0,19	0,75	0,38	256	0,75
1077		0,5	1,5	0,19	1	0,75	256	0,75
1086		0,75	1,5	0,38	0,75	0,5	256	0,75
1092		0,5	2	0,125	0,5	0,25	0,25	0,75
1112		0,75	1	0,25	0,5	0,38	0,19	0,75
1113		0,5	0,75	0,19	0,38	0,25	256	0,75
1121		0,75	2	0,25	1	0,5	256	0,75
1123		0,38	1	0,19	0,5	0,5	0,25	0,75
1125		0,38	1,5	0,19	1	0,5	0,19	0,75
1128		0,5	1,5	0,19	0,75	0,75	0,19	0,75
1129		0,19	1,5	0,25	0,5	0,38	0,125	1
1130		0,75	1,5	0,25	0,5	0,5	0,25	1
1131		0,125	1,5	0,15	2	0,38	0,5	0,75
1142		0,38	2	0,125	1	0,38	0,38	0,75
1143		0,38	2	0,25	0,5	0,38	0,38	1
1148		0,5	1,5	0,125	0,5	0,38	0,38	1
1474		0,38	1,5	0,094	1,5	0,25	256	0,75
1477	<i>Lactococcus</i>	0,5	1,5	0,125	0,5	0,38	256	0,5
1478		0,25	1	0,094	0,75	0,5	256	1
1481		0,5	1,5	0,19	1	0,38	256	0,75
1491		0,38	1,5	0,19	0,5	0,5	0,25	1
1497		0,25	1,5	0,19	0,38	0,25	256	1
1500		0,38	2	0,19	0,75	0,75	0,5	1
1501		0,38	1,5	0,19	1	0,38	0,38	1
1521		0,38	1	0,25	0,75	0,38	0,25	0,75
1540		0,75	0,75	0,094	0,75	0,38	0,25	1
1544		0,5	1,5	0,19	0,5	0,25	256	1
1546	0,25	1	0,125	0,5	0,25	0,25	0,75	
1557	0,19	0,5	0,064	0,5	0,25	0,19	0,75	
1574	0,38	1	0,125	0,5	0,5	256	1,5	
1596	0,5	1	0,094	0,38	0,25	0,25	0,75	
1599	0,75	0,5	0,19	0,5	0,38	0,19	0,75	
1605	1	1,5	0,125	0,75	0,8	256	0,5	
1609	0,125	0,75	0,125	0,38	0,199	0,25	0,75	
1655	0,5	1	0,19	0,25	0,38	0,19	0,75	
1670	0,75	1,5	0,094	0,25	0	0,25	1	
1684	0,125	0,75	0,064	0,19	0,19	0,125	0,752	
3065	0,25	1	0,125	0,5	0,19	0,25	0,5	
1343	0,064	1	0,125	0,19	0,064	0,19	1	
1643	0,016	0,38	0,094	0,094	0,094	0,19	0,75	

Criblage 2		Antibiotique : MIC concentration (µg/mL)				
UCMA	Genre	Ampicilline	Ciprofloxacine	Lévofloxacine	Piperacilline	Vancomycine
1120	<i>Enterococcus</i>	1	1	2	8	1
1619		0,38	2	1	3	1

Annexe 6 : Valeurs de la concentration minimale inhibitrice pour les isolats issus du criblage 2
contre les différents antibiotiques

		<i>Aerococcus urinaequei</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>												<i>Lactococcus laudensis</i>	Non ensemencé
	UCMA	5972	1676	1495	1151	9863	1067	1131	1501	1521	1546	1596	1599	1609	1684	1343	Lait
Flore protectrice 1	T = 0	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	T = 2 h	6,2	6,4	6,3	6,3	6,5	6,3	6,5	6,2	6,3	6,3	6,6	6,2	6,0	6,6	6,5	6,5
	T = 18 h	4,6	4,4	4,3	4,4	4,3	4,4	4,7	4,3	4,4	4,5	4,4	4,4	4,4	4,4	4,5	4,5
	T = 24 h	4,4	4,3	4,3	4,3	4,6	4,3	4,6	4,2	4,3	4,4	4,3	4,2	4,3	4,3	4,6	4,5
Ferments lactiques mésophiles 1	T = 0	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	T = 2 h	6,5	6,2	6,5	6,4	6,4	6,4	6,4	6,3	6,4	6,3	6,5	6,1	6,1	6,4	6,3	6,5
	T = 18 h	4,6	4,4	4,5	4,4	4,6	4,5	4,6	4,4	4,3	4,5	4,5	4,3	4,4	4,5	4,5	4,6
	T = 24 h	4,5	4,3	4,4	4,3	4,4	4,4	4,5	4,3	4,3	4,4	4,4	4,3	4,3	4,5	4,5	4,5
Ferments lactiques mésophiles 2	T = 0	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
	T = 2 h	6,5	6,4	6,3	6,5	6,3	6,4	6,4	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,3	6,3
	T = 18 h	4,4	4,4	4,5	4,4	4,5	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,7	4,7
	T = 24 h	4,3	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,3	4,3	4,4	4,4	4,4	4,7	4,7
Souches seules	T = 0	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
	T = 2 h	6,3	6,2	6,2	6,1	6,2	6,3	6,3	6,3	6,4	6,3	6,3	6,2	6,3	6,3	6,5	6,57
	T = 18 h	5,6	5,0	4,9	4,6	4,9	5,0	5,1	5,1	5,1	5,1	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	6,5
	T = 24 h	5,7	4,8	4,8	4,5	4,8	4,9	5,0	5,1	5,1	5,0	4,9	4,9	4,9	4,9	5,0	6,53

* : Ces test ont été effectuée ultérieurement sur les 15 isolats retenus lors de essais pré-associations (§ 5, p 182)

Annexe 7 : Valeurs de pH obtenues lors de la culture des ferments de fromagerie en présence des candidats bioprotecteurs*

Matière azotée non protéique en g/100g (incertitude)				
Association	Association 1	Association 2	Association 3	Témoin
J2	0,154 (0,023)	0,108 (0,016)	0,166 (0,025)	0,191 (0,029)
J7	0,327 (0,049)	0,233 (0,035)	0,457 (0,069)	0,358 (0,054)
J21	0,42 (0,064)	0,434 (0,065)	0,45 (0,068)	0,485 (0,073)
J35	0,273 (0,041)	0,510 (0,77)	0,500 (0,075)	0,534 (0,080)
J65	0,769 (0,115)	0,892 (0,134)	0,748 (0,112)	0,828 (0,124)
Azote total g/100g (incertitude)				
Association	Association 1	Association 2	Association 3	Témoin
J2	3,34 (0,07)	2,99 (0,07)	3,06 (0,07)	2,89 (0,07)
J7	2,81 (0,07)	3,32 (0,07)	2,94 (0,07)	3,03 (0,07)
J21	3,14 (0,07)	3,17 (0,07)	3,23 (0,07)	3,78 (0,07)
J35	3,49 (0,07)	3,67 (0,07)	3,43 (0,07)	3,56 (0,07)
J65	3,86 (0,07)	3,59 (0,07)	3,21 (0,07)	3,41 (0,07)

Annexe 8 : Concentration en matière azotée non protéique et totale au cours de l'affinage des Camemberts issus des fabrications pilote

TROISIEME PARTIE : VALORISATION SCIENTIFIQUE

Communications orales (le nom de l'orateur est souligné) :

- Dalmasso M, Lelièvre V, **Besnard A**, Schlusshuber M, Desmasures N. 2018. Anti-*Salmonella* bacteriophages for insuring the safety of soft cheeses. The 10th Cheese Symposium, 4-6 avril, Rennes, France.
- **Besnard A**, Desmasures N, Schlusshuber M. 2018. Identification of anti-*Salmonella* bacterial strains by a high-throughput screening method. Congrès National de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre, Paris, France
- **Besnard A**, Bré JM, Schlusshuber M, Desmasures N. 2019. Potential of lactic acid bacteria to interact with *Salmonella* through nutritional competition in dairy-like media. 22ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, 12-14 juin, Caen, France.

Communications affichées :

- **Besnard A**, Desmasures N, Schlusshuber M. 2018. Development of a high-throughput method to screen micro-organisms exhibiting anti-*Salmonella* activity. International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis (IS), 24-26 septembre 2018, Saint-Malo, France
- Gréau L, Besnard A, Desmasures N, Schlusshuber M. 2019. Caractérisation de l'activité anti-*Salmonella* d'isolats laitiers du genre *Aerococcus*. 22ème Club des Bactéries Lactiques, 12-14 juin, Caen, France

Publications scientifiques :

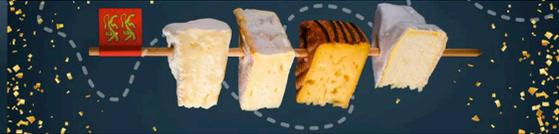
- Lelièvre V, **Besnard A**, Schlusshuber M, Desmasures N, Dalmasso M. 2019. Phages for biocontrol in foods: what opportunities for the control of *Salmonella* sp. along the dairy food chain? *Food Microbiology*, 78:89-98 doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.009
- Schlusshuber M, **Besnard A**, Lelièvre V, Dalmasso M, Desmasures N. 2020. Limitations and needs for *Salmonella* control along the dairy food chain production. (A soumettre)
- **Besnard A**, Desmasures N, Voisin-Anastasie A, Greau L, Lelièvre V, Dalmasso M, Bre JM, Schlusshuber M. 2021. *Aerococcus* sp., a promising genus as a source of anti-*Salmonella* bioprotective agents for the 2 dairy industry revealed by a miniaturized screening method. *International Dairy Journal*, 116 :104949 doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104949



Development of a high-throughput method to screen micro-organisms exhibiting anti-*Salmonella* activity

A. BESNARD, N. DESMASURES, M. SCHLUSSELHUBER

Normandie Univ, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen, France



INTRODUCTION

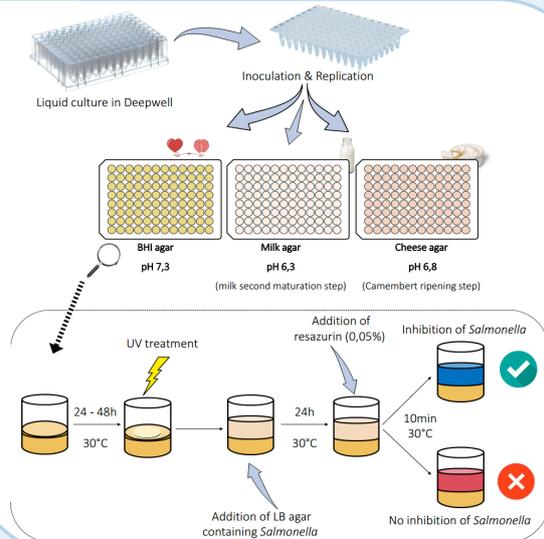
In France, Normandy is well known for its emblematic Protected Designation of Origin (PDO) cheeses. 67% of these cheeses are made from raw milk which can be sometimes contaminated on farm with pathogenic bacteria, especially *Salmonella*. This pathogen is the second agent responsible for zoonose in Europe¹. To improve the safety of raw milk cheeses, the CESam project has been undertaken, with the aim of controlling *Salmonella* during cheese making process using biopreservation. In this context, a high-throughput screening method has been developed to screen a high number of micro-organisms for anti-*Salmonella* activity, with various modes of action, in experimental conditions close to PDO Camembert making process.

OBJECTIVES

- ✓ High-throughput method
- ✓ Easy way to read results
- ✓ Compatible with various modes of action
- ✓ Possibility to use opaque medium
- ✓ Conditions close to cheese making process

MATERIALS & METHODS

- Method based on the spot on-lawn technique² with modifications and miniaturized in a 96 wells plate
- Anti-*Salmonella* strains with various modes of action & pure antimicrobial products :
 - ✓ *Lactococcus lactis* UCMA 1771 (Bacteriocin production)
 - ✓ hydrogen peroxyde (1 mM)
 - ✓ lactic acid (850 µM)
 - ✓ *Aerococcus viridans* UCMA 5972 (unknown action)
 - ✓ *Pseudomonas lundensis* UCMA 7402 (unknown action)
 - ✓ *Pediococcus parvulus* UCMA 16814 (unknown action)
- *Salmonella* strains tested :
 - ✓ *Salmonella* Newport CIP 105629
 - ✓ *Salmonella* Typhimurium LMG 7233
- *Salmonella* growth revealed by resazurin reduction into pink colored resofurin.



RESULTS

Validations*	Blue	Pink
Lactic acid 850 µM	✓	
H ₂ O ₂ 1 mM	✓	
<i>Lactococcus lactis</i>	✓	
<i>Pseudomonas lundensis</i>	✓	
<i>Pediococcus parvulus</i>	✓	
<i>Aerococcus viridans</i>	✓	
Negative control (sterile LB)	✓	
<i>Salmonella</i> growth control		✓

*NB : Validations were made on both *Salmonella* strains and for all medium

The activity of all anti-*Salmonella* strains and compounds was confirmed with this high-throughput screening method.

Contact: alexandra.besnard@unicaen.fr

CONCLUSION

- The screening method developed has been validated with various anti-*Salmonella* strains and compounds. Various modes of action can be detected (including the production of bacteriocin, lactic acid and H₂O₂).
- Miniaturization and replication allow to screen a lot of strains in various conditions at the same time.
- Detection with resazurin allow the use of opaque medium that can be adapted for specific field study (i.e. milk or cheese agar in the case of dairy application).
- This method can be adapted for other pathogenic agents.

REFERENCES

- ¹ EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al., « Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016 », EFSA J., vol. 15, no 3, mars 2017.
- ² H. P. Fleming, J. L. Etchells, et R. N. Costilow, « Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines », *Applied Microbiology* 30, n° 6 (12 janvier 1975): 1040-42.



Caractérisation de l'activité anti-Salmonella d'isolats laitiers du genre Aerococcus

L. GRÉAU, A. BESNARD, N. DESMASURES, M. SCHLUSSELHUBER
Normandie Université, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen, France



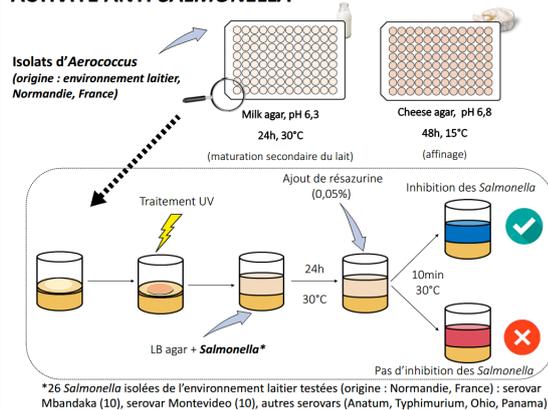
INTRODUCTION

La Normandie est bien connue pour ses quatre fromages AOP emblématiques, dont le Camembert de Normandie. Néanmoins ces produits au lait cru peuvent être sujets à des contaminations par des pathogènes comme *Salmonella enterica*. Le projet CESam a pour but d'identifier différents organismes qui pourraient être utilisés de manière combinée en tant que bioprotecteurs dans le but d'augmenter la durée de vie des produits mais également d'en réduire les risques sanitaires (1). Les bactéries lactiques sont bien connues pour la production de diverses molécules antimicrobiennes (H₂O₂, acides organiques, bactériocines...) et constituent de ce fait des candidats idéaux (2). Parmi celles-ci, le genre *Aerococcus* est fréquemment rencontré dans l'environnement laitier (3) mais très peu étudié pour son potentiel antimicrobien.

OBJECTIFS

- Déterminer l'activité anti-*Salmonella* (26 isolats de l'environnement laitier) de 10 candidats du genre *Aerococcus* dans des conditions mimant la maturation du lait et l'affinage du Camembert de Normandie
- Déterminer les conditions optimales de production et la nature des molécules produites

ACTIVITE ANTI-SALMONELLA



Pourcentage d'isolats de *Salmonella* inhibés par 3 isolats représentatifs d'*Aerococcus* :

Milk Agar	Isolats d' <i>Aerococcus</i>			Cheese Agar	Isolats d' <i>Aerococcus</i>		
	UCMA 5972	UCMA 6078	UCMA 6761		UCMA 5972	UCMA 6078	UCMA 6761
Mbandaka	9/10	9/10	3/10	Mbandaka	10/10	10/10	10/10
Montevideo	9/10	10/10	3/10	Montevideo	10/10	9/10	9/10
Autres	6/6	6/6	3/6	Autres	6/6	6/6	6/6

CONCLUSION

Le criblage réalisé dans des conditions mimant celles que l'on peut retrouver dans des processus de transformation fromagère a permis de mettre en évidence des isolats avec des profils d'activité différents : 2 isolats actifs sur les 2 milieux et 1 isolat plus actif en fromage qu'en lait.

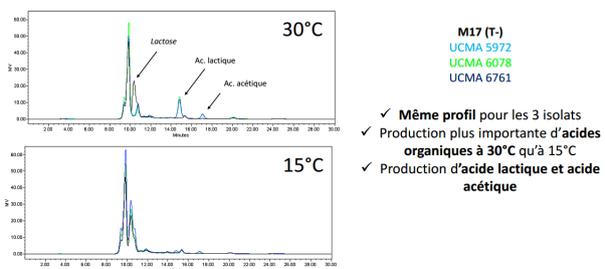
Différents profils au niveau des molécules impliquées dans l'activité anti-*Salmonella* ont également pu être observés :

Molécules impliquées	Profil 1	Profil 2	Profil 3	ND : Non détecté
	UCMA 5972	UCMA 6078	UCMA 6761	
Ac. lactique + Ac. acétique	+	+	+	
H ₂ O ₂	+	-	ND	
Sensible aux protéases	-	+	ND	
Résistante aux protéases	-	-	+	

Les différents profils d'activité anti-*Salmonella* observés en fonction du milieu et des types de molécules impliquées rendent le genre *Aerococcus* intéressant pour une potentielle utilisation en tant que bioprotecteur.

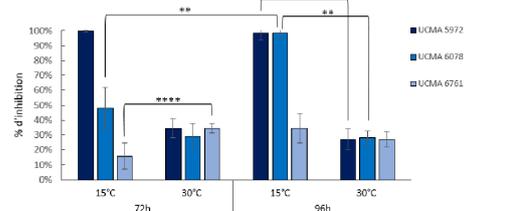
PRODUCTION D'ACIDES ORGANIQUES

Les trois isolats d'*Aerococcus* ont été cultivés en milieu M17 lactosé à 15 et 30°C pendant 96h. Les surnageants de culture ont été analysés par HPLC avec détection par réfractométrie (colonne Carboxim HNP5, phase mobile : H₂SO₄ 5mM, mode isocratique).



RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES POUR LA PRODUCTION D'AUTRES MOLÉCULES ANTI-SALMONELLA

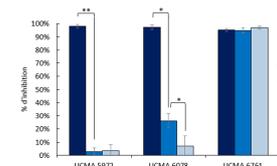
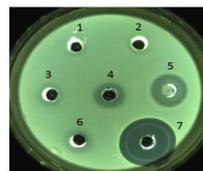
Les trois isolats d'*Aerococcus* ont été cultivés en milieu M17 lactosé tamponné à 15°C, 30°C, 37°C pendant 24, 48, 72 et 96 heures. L'inhibition de la croissance de *S. Mbandaka* CIP 105859^T par les surnageants a été mesurée par lecture de densité optique après 24h d'incubation à 30°C.



- ✓ Une incubation courte (24,48h) ou à 37°C ne permet pas d'obtenir une activité maximale
- ✓ Conditions optimales pour UCMA 5972 (15°C, temps >72h), UCMA 6078 (15°C 96h), UCMA 6761 (30°C, > 72h)

EXTRACTION DES MOLECULES ACTIVES

Les trois isolats ont été cultivés dans les conditions optimales déterminées précédemment. Le surnageant a été extrait avec de l'acétate d'éthyle, avant évaporation et reprise du résidu avec de l'eau/acétonitrile (=extrait). Le milieu M17 TP stérile a également été extrait dans les mêmes conditions (témoin). L'activité des extraits a été déterminée sur *S. Mbandaka* CIP 105859^T par diffusion sur gélose (50 µl déposés) et en milieu liquide. Les extraits ont été traités à la catalase (30 min, 30°C), et pronase (1 h, 37°C) pour déterminer le type de molécules produites.



- ✓ Différents types de molécules anti-*Salmonella* produites en fonction de l'isolat d'*Aerococcus*

RÉFÉRENCES

- (1) Garnier, L. et al., (2019). Development of antifungal ingredients for dairy products: from *in vitro* screening to pilot scale application. *Food Microbiol*, 81, pp.97–107.
- (2) Calo-Mata, P. et al., (2008). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Tech*, 1, pp.43-63.
- (3) Mallet, A. et al., (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int Dairy J*, 27, pp. 13-21.

Contact : margot.schlusshuber@unicaen.fr



Aerococcus sp., a promising genus as a source of anti-*Salmonella* bioprotective agents for the dairy industry revealed by a miniaturised screening method



Alexandra Besnard^{a, b}, Nathalie Desmasures^a, Alexandre Voisin-Anastasie^a, Lillian Gréau^a, Virginie Lelièvre^a, Jean-Michel Bré^a, Marion Dalmasso^a, Margot Schlusshuber^{a, *}

^a Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, 14000, Caen, France

^b Gillot SAS, 61220 Saint-Hilaire de Briouze, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2020

Received in revised form

27 November 2020

Accepted 28 November 2020

Available online 8 December 2020

ABSTRACT

Biopreservation is a promising technology for insuring safety of food. This study evaluated the anti-*Salmonella* potential of 1450 dairy isolates from 54 genera, in conditions mimicking dairy matrices, to find new bioprotective strains. Among the screened isolates, 6.4% exhibited an antagonistic activity towards at least one of the two *Salmonella* Mbandaka and Montevideo reference strains. *Lactococcus* sp. generated the highest number of bioprotective candidates, followed by *Aerococcus* sp. from which seven isolates were able to inhibit at least 80% of 20 *Salmonella* strains in milk medium and/or cheese medium. Inhibition by *Aerococcus* sp. was characterised by the production of hydrogen peroxide (30–100 mg L⁻¹) and acetic acid (0.23–0.34 g L⁻¹). *Aerococcus* sp. appears to be a new promising source of bioprotective agents against *Salmonella* in dairy matrices, along with the well-described *Lactococcus* genus.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In Europe, ~500,000 tons of raw milk cheeses are produced each year (IDF, 2016). The use of raw milk leads to undeniable advantages for milk producers, cheese makers, as well as for consumers. Because raw milk cheeses are high added value products, the price of the raw milk collected to produce them is also higher than that of raw milk destined to the production of pasteurised products (Casabianca & Jeanneaux, 2020). The organoleptic qualities of raw milk cheeses are also recognised to be stronger than for processed cheeses thanks to an abundant native microbiota (Montel et al., 2014). However, raw milk cheeses, mainly semi-soft and semi-hard cheeses, are more susceptible to the presence and growth of some bacterial pathogens and can be potential vehicles for food-borne outbreaks. Regarding the latter issue among the zoonotic pathogens that the dairy industry must face, the most recorded are pathogenic *Campylobacter* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and

enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* (Jourdan-da Silva et al., 2018).

Salmonella is one of the food-borne pathogens responsible for the highest number of human cases. It was associated in 2018 in Europe to 1581 food-borne outbreaks that were reported by the EFSA (EFSA, 2019) leading to 11,581 human cases. In foods and animals, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, monophasic *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis and *Salmonella* Derby are the most encountered serovars in Europe. These serovars are also considered to be the most reported in human cases (ESFA, 2019), but their occurrence is country-dependent, food-dependent, and tends to fluctuate over time.

Preventing the occurrence of *Salmonella* in raw milk cheeses is of utmost importance for sanitary and economic reasons. On farms, diverse sanitary measures can be implemented to reduce the risk of *Salmonella* contamination during milking. Nevertheless, these preventive practices are not always effective enough, and complementary approaches have to be used (Schlusshuber et al., unpublished).

Among such approaches, biopreservation has received an increased interest over the last decade. Biopreservation has been

* Corresponding author. Tel.: +33 2 31 56 57 82.

E-mail address: margot.schlusshuber@unicaen.fr (M. Schlusshuber).

defined as the use of natural microflora and/or their antimicrobial compounds to extend food shelf-life and enhance food safety (Stiles, 1996). Using microorganisms (whether they originate or not from the natural microflora) and their products to preserve food has been practiced in many areas (Ross, Morgan, & Hill, 2002). The microflora of most fermented foods is mainly composed of lactic acid bacteria (LAB). LAB are known for their high biopreservation potential and are generally recognised as safe for human. These bacteria are able to produce a large variety of antimicrobial substances such as organic acids, hydrogen peroxide, biosurfactants (Sharma, 2016) and bacteriocins (Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007). When used as bioprotective cultures, they can contribute to a number of ways to control pathogens (Ben Said, Gaudreau, Dallaire, Tessier, & Fliss, 2019) and to extend the shelf-life of fermented foods (Leyva Salas et al., 2017).

Microorganisms other than LAB can also be used for biopreservation. One strain of *Brevibacterium linens*, a bacterial species commonly used for cheese ripening, was shown to have a protective effect against *Listeria* sp. in red smear cheese (Eppert, Valdés-Stauber, Götz, Busse, & Scherer, 1997) and predicted bacteriocin biosynthesis genes were present in most of the *Brevibacterium* strains previously investigated (Pham et al., 2017). In soft cheese, a *Staphylococcus equorum* strain was able to inhibit *L. monocytogenes* growth by producing a bacteriostatic substance (Carnio et al., 2000). Staphylococcal bacteriocins can also be used to control *Staphylococcus aureus* in cheese (Miceli de Farias, dos Santos Nascimento, Cabral da Silva Santos, & de Freire Bastos, 2019). In addition to bacteria, yeasts isolated from smear ripened cheeses can also have an inhibitory action against pathogens like *L. monocytogenes* (Dieuleveux, Van Der Pyl, Chataud, & Gueguen, 1998; Goerges, Aigner, Silakowski, & Scherer, 2006).

To select antagonistic bacterial isolates, screening methods can be employed such as the commonly used agar diffusion assay (Abraham et al., 1941). This method allows to detect the inhibition due to acidification (in unbuffered medium) and/or to the production of non-specific (e.g., hydrogen peroxide) and specific (e.g., bacteriocin) inhibitory compounds. Despite the common use of this method, it cannot be applied when using opaque media. Therefore, classical nutrient agar media are often used, but their composition do not reproduce the composition of complex food matrices such as dairy products.

The aim of this study was to select microbial isolates exhibiting inhibitory activity towards *Salmonella*, through the production of chemical compounds, in conditions encountered during semi-soft cheese making process. A new miniaturised screening method was designed and used to screen a collection of dairy microbial isolates. The most promising bioprotective strains were identified, and the mechanisms involved in their activity were investigated.

2. Materials and methods

2.1. Microbial strains and growth conditions

This study is part of a project targeting serovars encountered specifically in Normandy region. The most encountered serovars in Normandy in 2012–2017 were *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka (hereinafter referred to as *S. Mbandaka*) and *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo (hereinafter referred to as *S. Montevideo*). Two reference strains from the Institut Pasteur (Paris, France), *S. Mbandaka* CIP 105.859 and *S. Montevideo* CIP 104.583, were initially used as primary targets for a pre-screening procedure. Then, ten *S. Mbandaka* and ten *S. Montevideo* strains, isolated from various farms in Normandy (France) were further used for screening assays (Table 1). All the strains were routinely stored in 15% glycerol at -80°C .

Salmonella strains were grown at 30°C for 24 h in Luria Bertani (LB) broth pH 7.5 made with 10 g L^{-1} casein pancreatic peptone (Biokar), 5 g L^{-1} yeast extract (Biokar) and 10 g L^{-1} NaCl (Fisher). A total of 1450 bacterial and yeast isolates from the UCMA collection (Université de Caen Normandie, France), collected between 1978 and 2016 in dairy environments from the Normandy region, were screened for inhibitory activities towards *Salmonella* strains. All the screened isolates were routinely grown in brain heart infusion pH 7.4 (BHI, Conda), for 24 h at 30°C in Deepwell® from one colony. This medium was chosen as it allows growth of most microbial groups investigated in this study, including Gram positive and Gram negative bacteria, and yeasts.

2.2. Development of a miniaturised method to screen microbial isolates for anti-Salmonella activities

A miniaturised method based on the agar diffusion plate method was developed in 96-well microtiter plates (Fig. 1). The screened microbial isolates were cultivated in Deepwell® plates in conditions mentioned above. After incubation, a replicator was used to transfer a few microliters (2–3 μL) from the Deepwell® plate cultures onto the surface of the agar media used as the first layer in 96-well microtitre plates (agar layer of about 100 μL). Three different media were used as first layer: BHI agar (commonly used in literature for bacterial screening, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2004) milk agar, or cheese agar). The two later were used to mimic the nutritional and physicochemical conditions encountered during two processing steps in the manufacture of semi-soft cheese. Milk agar pH 6.3 was used to mimic the end of the milk maturation step, just before renneting, and was composed of 100 g L^{-1} of skim milk powder (Difco) and 12 g L^{-1} of bacteriological agar (Conda). Cheese agar was used to mimic cheese ripening and was prepared as previously described by (Guichard & Bonnarme, 2005) using 2.4% NaCl, 60% of unsalted Camembert cheese curd and 1.7% agar (Biokar). To allow the growth of acid-sensitive isolates, particularly belonging to the *Actinobacteria* class, pH was adjusted to 6.8.

Microtitre plates containing inoculated BHI agar and milk agar were then incubated at 30°C for 24 h, and those containing inoculated cheese agar were incubated at 15°C for 48 h. After incubation, the resultant growth was killed by UV irradiation (0.124 J cm^{-2}) for 15 min (Daly et al., 2010). In each well, a 70 μL overlay of soft LB agar (0.8% agar) inoculated with an overnight culture of *Salmonella* was added (final concentration of 10^6 cfu mL^{-1}). All the plates were incubated at 30°C for 24 h (Fig. 1).

After the 24 h-incubation step, *Salmonella* viability was revealed using a blue-dye resazurin test. Resazurin dye was prepared extemporaneously in phosphate sodium buffer (pH 7.4) at a concentration of 0.05% (w/v) and sterilised using PES filter (0.22 μm pore size). In each well, 20 μL of resazurin solution were deposited onto the agar surface. After 5 min at room temperature, the coloration of the entire upper layer in each well was recorded and compared with a positive control (*Salmonella* growth in LB agar) and a negative control (sterile LB agar overlay). A pink colour revealed the viability of *Salmonella* whereas a blue colour indicated its inhibition (Fig. 1). All the microbial isolates showing an antagonistic activity (blue coloration of the well) were tested in duplicate to confirm the inhibition of *Salmonella*.

All the isolates were tested for their activity against the two *Salmonella* reference strains. The isolates inhibiting of one or both reference strains were then tested, in duplicate, against twenty *Salmonella* field strains (Table 1).

2.3. Identification of the inhibition mechanisms of selected antagonist isolates

2.3.1. Detection of anti-Salmonella compounds in cell-free supernatants of antagonistic isolates

The isolates exhibiting antagonistic activity towards at least 16 of the 20 (80%) *Salmonella* strains (Table 1) were selected to investigate the mechanisms of inhibition. This arbitrary inhibition threshold of 80% was intended to select the isolates with the widest spectrum of inhibitory activity towards *Salmonella*.

Liquid cheese synthetic medium (CSM, pH 6.8) was prepared as previously described (Mansour, Beckerich, & Bonnarme, 2008). Liquid milk synthetic medium (MSM, pH 6.3) was prepared from CSM with modifications: lactose and sodium lactate concentrations were adjusted to 48.5 g L⁻¹ and 1 g L⁻¹, respectively. Isolates were grown in 5 mL of media from one colony for 72 h at 150 rpm at either 30 °C (MSM) or 15 °C (CSM). Cells from 5 mL of culture were pelleted by centrifugation at 4150×g for 10 min at room temperature, and the cell-free supernatants (CFS) were obtained by filtering through 0.22 µm PES filters (Nalgene) and then stored at -20 °C until use. *Salmonella* Mbandaka CIP 105.859 was cultured in 5 mL of LB from one colony and incubated 24 h at 37 °C. *Salmonella* concentration was then adjusted at 5 × 10⁶ cfu mL⁻¹ in LB broth twice concentrated.

CFS were tested against *S. Mbandaka* CIP 105.859 to assess the contribution to the detected anti-*Salmonella* activities of the potential production of organic acids, hydrogen peroxide, proteinaceous compounds and biosurfactants. Four treatment conditions were applied to CFS, i.e., non-treated, neutralised, neutralised treated with catalase, and neutralised treated with pronase. The CFS pH was neutralised to pH 7 with 6 N NaOH. The neutralised CFS were treated with catalase (100 mg mL⁻¹, Sigma) at 30 °C for 30 min, or pronase (100 mg mL⁻¹, Serva) at 37 °C for 2 h. One hundred microlitres of treated (neutralised, catalase-treated, or pronase-treated) or non-treated CFS were mixed with 100 µL *S. Mbandaka* CIP 105.859 LB culture, into microplate wells, reaching a final *Salmonella* concentration of 2.5 × 10⁶ cfu mL⁻¹. The microplates were incubated at 30 °C for 24 h. After incubation, *Salmonella* inhibition was evaluated by comparing OD_{600nm} in control wells (*S. Mbandaka* without CFS) and in assay wells containing both *S. Mbandaka* and CFS. Inhibition was expressed by the OD_{600nm} ratio between assay and control. Non-treated CFS were considered active against *Salmonella* when at least 80% inhibition were observed. The activity of treated CFS was assessed in triplicate by comparing with the activity of non-treated CFS.

For the rapid screening of biosurfactant production, non-treated CFS were subjected to a drop-collapse assay (Walter, Syldatk, & Hausmann, 2010). Briefly, 5 µL of non-treated CFS were mixed with 1 µL of methylene blue to improve visualisation before a drop assay onto a hydrophobic surface (Parafilm®). The stability of the drop was checked and compared with a negative control (sterile medium). If CFS contains biosurfactants, the drop spreads because the interfacial tension between the drop and the hydrophobic surface is reduced.

Hydrogen peroxide production in active non-treated CFS was quantified using H₂O₂ Dosatest strip® (0–100 mg mL⁻¹, VWR).

2.3.2. Detection and quantification of major organic acids by high performance liquid chromatography

Reverse phase HPLC (Waters Alliance HPLC system with 2695 pump and 2998 PDA detector) was performed at 0.6 mL min⁻¹ and 40 °C on a CarboMix HNP5 8% cross-linking 7.8 × 300 mm (Sepax). Elution was performed in an isocratic mode for 30 min using 5 mM H₂SO₄ buffer as mobile phase and monitored at 210 nm. Active CFS of selected strains grown in MSM medium were two

fold diluted with mobile phase before injection of 10 µL. For quantification of lactic and acetic acids in each CFS, acid standards were injected in concentrations ranging from 2 mM to 64 mM (Sigma). Several standards of organic acids were also injected at 64 mM to compare elution time with produced molecules in active CFS: citric (Panreac), fumaric (Acros), formic (Sigma), butyric (Fluka), benzoic (Panreac), succinic (Sigma) and phenyllactic acids (Sigma).

3. Results

3.1. Antagonistic activities of microbial isolates towards two *Salmonella* reference strains

The miniaturised screening method developed in the current study was used to assess the anti-*Salmonella* activity of 1450 isolates against two reference *Salmonella* strains, *S. Mbandaka* CIP 105.859 and *S. Montevideo* CIP 104.583, in BHI, milk agar and cheese agar (Table 2). This method was validated using strains previously screened using agar diffusion assays and showing antagonism, through production of chemical compound, toward one *Salmonella* strain used in this study. Around one-third of the screened isolates belonged to the *Lactococcus* genus.

Among the 1450 isolates, 93 (6.4%) were able to inhibit at least one *Salmonella* reference strain in BHI. Seventy-three (5%) isolates inhibited *S. Mbandaka* CIP 105.859 whereas 55 (3.85%) inhibited *S. Montevideo* CIP 104.583 strain in this medium. Thirty-five (2.4%) isolates inhibited both *Salmonella* strains in these conditions.

In milk medium, 119 isolates (8.2%) inhibited *S. Mbandaka* CIP 105.859 and 135 (9.3%) inhibited *S. Montevideo* CIP 104.583. In this medium, 61 isolates (4.2%) displayed an antagonistic activity against the two *Salmonella* strains.

In cheese medium, results were similar to those obtained in milk medium. A total of 118 (8.1%) isolates were active against *S. Mbandaka* CIP 105.859 and 132 (9.1%) against *S. Montevideo* CIP 104.583 (Table 2). Forty-four isolates (3%) inhibited both *Salmonella* strains. Antagonistic isolates were different depending on the medium and on the *Salmonella* strains.

As shown in Table 2, isolates displaying an anti-*Salmonella* activity belonged predominantly to the *Lactococcus* genus, followed by, in descending order, *Aerococcus* sp., *Lactobacillus* sp., and

Table 1
Salmonella enterica ssp. *enterica* strains used in this study.

Serotype	Strain number	Origin	
Mbandaka	UCMA 17913	Milk	
	UCMA 19835	Manure	
	UCMA 19837	Raw milk	
	UCMA 19842	Raw milk	
	UCMA 19851	Plastic around fodder	
	UCMA 19892	Faeces	
	UCMA 19906	Feeding area	
	UCMA 19909	Raw milk	
	UCMA 19917	Raw milk	
	UCMA 20264	Milk	
	CIP 105.859	Faeces	
	Montevideo	UCMA 19832	Raw milk
		UCMA 19834	Manure
		UCMA 19840	Water
UCMA 19867		Faeces	
UCMA 19870		Puddle	
UCMA 19876		Feeding mix	
UCMA 19889		Faeces	
UCMA 19904		Tractor wheel	
UCMA 20260		Raw milk	
UCMA 20266		Milk	
CIP 104.583	Monkey		

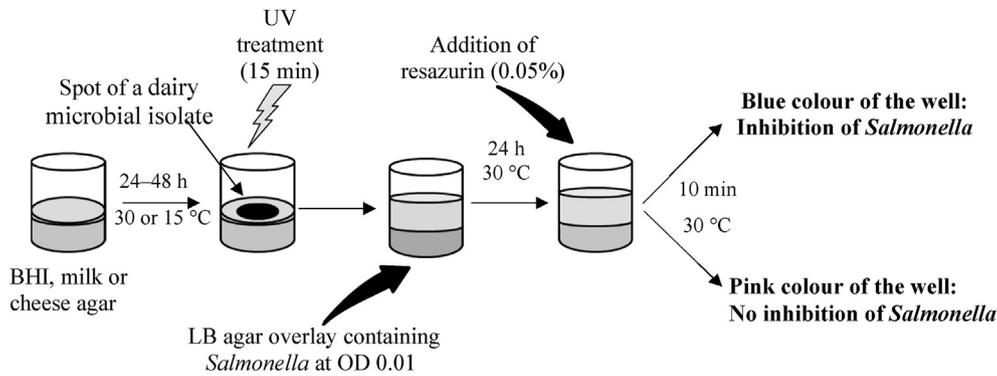


Fig. 1. Miniaturised screening method developed in the current study; the cylinder represents one well of a 96-well microplate.

Leuconostoc sp. Some antagonistic isolates were also found among other bacterial genera, including *Alcaligenes* sp., *Brachybacillus* sp., *Hafnia* sp., *Pseudomonas* sp., *Raoultella* sp., *Staphylococcus* sp., and *Weissella* sp., and among yeasts (*Candida* sp. and *Yarrowia* sp.). The genus *Aerococcus* was associated with a noticeable inhibitory activity towards *Salmonella* strains, since more than half of the isolates were active (Table 2). Over the 31 screened *Aerococcus* strain, 29 (93%) were able to inhibit at least one *Salmonella* strain in at least one medium.

3.2. Screening of selected isolates against 20 *Salmonella* strains originating from dairy environments

Based on the previous results, 49 isolates were selected according to their taxonomic affiliation and their inhibitory activity towards the reference *Salmonella* strains in either milk agar or cheese agar (Table 3). They were screened using the miniaturised method with milk medium and cheese medium against twenty *Salmonella* isolates collected from farms' environment (Table 1).

Thirty-one out of the 49 isolates inhibited at least 16 out of the 20 *Salmonella* strains in one or in both media (Table 3). Among them, three *Lactococcus* sp., two *Aerococcus* sp., one *Alcaligenes* sp., one *Leuconostoc* sp., and one *Raoultella* sp. isolates displayed inhibition only in milk medium. Eleven isolates (six *Lactococcus* sp., three *Aerococcus* sp., one *Pseudomonas* sp., and one *Streptococcus* sp.) inhibited *Salmonella* strains only in cheese medium. Ten *Lactococcus* sp., and two *Aerococcus* sp. isolates were active in both milk and cheese media. None of the tested field *Salmonella* strains was resistant to all the screened isolates.

3.2.1. Inhibition mechanisms of the active isolates in milk and cheese media

The 49 isolates selected on the previous step were grown either in MSM, CSM or both media (according to their previous activities through the miniaturised method in milk medium, cheese medium or both) to test CFS activities against *S. Mbandaka* CIP 105.859. Similar results were obtained for both *Salmonella* strains so only the results obtained for *S. Mbandaka* CIP 105.859 strain are shown

Table 2
Antagonistic activities of the 1450 screened dairy isolates towards two *Salmonella* reference strains.^a

Presumed genus	Number of screened isolates	Number (%) of antagonistic isolates					
		<i>Salmonella</i> Mbandaka CIP 105.859			<i>Salmonella</i> Montevideo CIP 104.583		
		BHI	Milk	Cheese	BHI	Milk	Cheese
<i>Aerococcus</i>	31	19 (61.3)	17 (54.8)	20 (64.5)	14 (45.2)	19 (61.2)	18 (58.1)
<i>Alcaligenes</i>	3	1 (33.3)	1 (33.3)	0	2 (66.6)	1 (33.3)	0
<i>Candida</i>	9	6 (66)	1 (11.1)	0	3 (33.3)	1 (11.1)	0
<i>Enterococcus</i>	30	1 (3.3)	4 (13.3)	3 (10)	0	7 (23.3)	8 (26.6)
<i>Geotrichum</i>	4	2 (50)	0	2 (50)	2 (50)	0	0
<i>Hafnia</i>	8	1 (12.5)	0	0	1 (12.5)	0	0
<i>Kluyveromyces</i>	9	2 (22.2)	0	1 (11.1)	2 (22.2)	0	0
<i>Lactobacillus</i>	322	4 (1.2)	14 (4.3)	9 (2.7)	3 (0.93)	11 (3.4)	8 (2.4)
<i>Lactococcus</i>	536	19 (3.5)	57 (10.6)	59 (11)	12 (2.2)	70 (13.1)	66 (12.3)
<i>Leuconostoc</i>	102	1 (0.9)	14 (13.7)	16 (15.6)	0	8 (7.8)	20 (19.6)
<i>Pediococcus</i>	3	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
<i>Pichia</i>	3	0	0	0	0	1 (33.3)	0
<i>Pseudomonas</i>	34	3 (8.8)	4 (11.7)	1 (2.9)	2 (5.8)	2 (5.8)	1 (2.9)
<i>Raoultella</i>	4	2 (50)	1 (25)	0	0	1 (25)	0
<i>Staphylococcus</i>	96	4 (4.1)	0	1 (1.1)	4 (4.1)	2 (2.1)	3 (3.3)
<i>Streptococcus</i>	10	1 (10)	1 (10)	1 (10)	0	3 (30)	1 (10)
<i>Weissella</i>	8	0	0	1 (12.5)	1 (12.5)	0	2 (25)
<i>Yarrowia</i>	3	1 (33.3)	1 (33.3)	0	1 (33.3)	1 (33.3)	0
No identification	66	5 (7.5)	3 (4.5)	3 (4.5)	7 (10.6)	7 (10.6)	4 (6.1)
Other isolates	169	0	0	0	0	0	0
Total isolates	1450	73 (5.0)	119 (8.2)	118 (8.1)	55 (3.8)	135 (9.3)	132 (9.1)

^a Other isolates were: *Acinetobacter* (7), *Arthrobacter* (17), *Brachybacillus* (3), *Brevibacillus* (1), *Brevibacterium* (12), *Carnobacterium* (6), *Corynebacterium* (23), *Cryptococcus* (1), *Curtobacterium* (1), *Cutaneotrichosporon* (1), *Debaryomyces* (2), *Dietzia* (1), *Escherichia* (1), *Ewingella* (1), *Exiguobacterium* (1), *Galactomyces* (2), *Gordonia* (1), *Halomonas* (1), *Jeotgaliococcus* (9), *Kocuria* (10), *Leifsonia* (2), *Leucobacter* (8), *Macroccoccus* (11), *Microbacterium* (13), *Micrococcaceae* (4), *Micrococcus* (3), *Obesumbacterium* (2), *Ochrobactrum* (3), *Pantoea* (1), *Pseudoclavibacter* (2), *Psychrobacter* (8), *Renibacterium* (1), *Rhodococcus* (4), *Rothia* (2), *Stenotrophomonas* (5), and *Trichosporon* (1).

Table 3

Dairy isolates exhibiting inhibitory activity towards field *Salmonella* strains in milk medium and/or cheese medium and characterisation of the inhibition mechanism associated to cell-free supernatant from MSM cultures.^a

UCMA strain number	Identity	Percentage of field <i>Salmonella</i> isolates inhibited		Selected isolate	<i>Salmonella</i> Mbandaka growth inhibition (%) by cell-free supernatant			
		Milk	Cheese		Non-treated	Neutralised	Catalase-treated	Pronase-treated
1676	<i>Leuconostoc citreum</i>	90	25	Yes	99	0	0	0
3915	<i>Raoultella planticola</i>	95	35	Yes	99	0	0	0
4132	<i>Alcaligenes faecalis</i>	95	0	Yes	0	0	0	0
4441	<i>Lactococcus lactis</i>	80	30	Yes	61	0	0	0
5972	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	85	20	Yes	99	97	0	99
13205	<i>Lactococcus lactis</i>	90	75	Yes	98	0	0	0
18022	<i>Lactococcus lactis</i>	85	40	Yes	99	0	0	0
18039	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	85	65	Yes	99	98	0	99
1049	<i>Lactococcus lactis</i>	75	80	Yes	–	–	–	–
1495	<i>Lactococcus lactis</i>	30	90	Yes	–	–	–	–
4512	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	45	85	Yes	–	–	–	–
6472	<i>Lactococcus lactis</i>	55	90	Yes	–	–	–	–
6731	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	40	90	Yes	–	–	–	–
6761	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	30	95	Yes	–	–	–	–
7402	<i>Pseudomonas lundensis</i>	55	100	Yes	–	–	–	–
9110	<i>Lactococcus lactis</i>	5	85	Yes	–	–	–	–
18010	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	70	85	Yes	–	–	–	–
21104	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	60	85	Yes	–	–	–	–
21105	<i>Streptococcus parauberis</i>	15	100	Yes	–	–	–	–
6078	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	85	95	Yes	98	98	0	99
1151	<i>Lactococcus lactis</i>	80	100	Yes	100	0	0	0
1044	<i>Lactococcus lactis</i>	100	100	Yes	98	0	0	0
1053	<i>Lactococcus lactis</i>	95	90	Yes	99	0	0	0
1068	<i>Lactococcus lactis</i>	90	90	Yes	99	0	0	0
1594	<i>Lactococcus lactis</i>	80	90	Yes	99	0	0	0
4571	<i>Lactococcus lactis</i>	90	95	Yes	80	0	0	0
6360	<i>Lactococcus lactis</i>	85	80	Yes	99	0	0	0
8483	<i>Lactococcus lactis</i>	95	95	Yes	99	0	0	0
8501	<i>Lactococcus lactis</i>	90	100	Yes	99	0	0	0
9863	<i>Lactococcus lactis</i>	90	95	Yes	68	0	0	0
18036	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	90	85	Yes	99	99	0	99
3066	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0	No	–	–	–	–
4459	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	60	60	No	–	–	–	–
4460	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	60	55	No	–	–	–	–
4514	<i>Staphylococcus xylosus</i>	35	45	No	–	–	–	–
4515	<i>Weissella hellenica</i>	55	10	No	–	–	–	–
4546	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	35	25	No	–	–	–	–
4935	<i>Lactococcus lactis</i>	0	75	No	–	–	–	–
5042	<i>Lactococcus lactis</i>	5	40	No	–	–	–	–
5744	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	75	65	No	–	–	–	–
7340	<i>Lactococcus lactis</i>	75	55	No	–	–	–	–
11210	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	15	No	–	–	–	–
11417	<i>Candida anglica</i>	25	0	No	–	–	–	–
12627	<i>Raoultella planticola</i>	65	15	No	–	–	–	–
12716	<i>Hafnia alvei</i>	5	0	No	–	–	–	–
18046	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	50	55	No	–	–	–	–
21106	<i>Enterococcus faecalis</i>	35	15	No	–	–	–	–
21107	<i>Lactococcus lactis</i>	75	75	No	–	–	–	–
21108	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	40	20	No	–	–	–	–

^a Isolate selected when able to inhibit at least 80% of field *Salmonella* strains - Non tested condition.

(Table 3). After 24 h incubation, the ratio between OD₆₀₀ obtained from *Salmonella* grown in the presence of CFS and OD₆₀₀ obtained in pure culture was calculated. CFS activity was considered as inhibitory toward *Salmonella* strain when values ≤ 0.20 (corresponding to 80% inhibition) were obtained. Twenty CFS were tested in MSM, and among them, seventeen non-treated CFS inhibited the reference strain, with at least 80% of inhibition. All the tested *Aerococcus* strains (n = 4) were active against both *Salmonella* strains. After CFS neutralisation, only these *Aerococcus* strains still inhibited *Salmonella* growth (96–99% of inhibition). None of the CFS inhibited *Salmonella* growth in CSM (data not shown).

All the active CFS, which pH ranged between 4.5 and 6.5, lost their inhibitory activity against the pathogen after pH

neutralisation except for the four *Aerococcus* isolates. According to these results, the inhibition mechanism of these isolates could be related to the production of organic acids combined with a pH effect. For the four *Aerococcus* sp. UCMA 5972, UCMA 18036, UCMA 18039 and UCMA 6078 strains, CFS was still active with pronase treatment, but not with catalase treatment. This suggests that the anti-*Salmonella* activity was mainly due to the production of hydrogen peroxide. This production was confirmed by H₂O₂ Dos-atest® strips, with quantities produced ranging from 30 to 100 mg L⁻¹ depending on the supernatant. After pronase treatment, all neutralised CFS kept their inhibitory activity. Therefore, none of the antagonistic activities were related to the presence of proteinaceous compounds such as bacteriocins. A drop-collapse

assay was performed on non-treated CFS to reveal the production of biosurfactants. None of the strains appeared to produce such molecules.

3.2.2. Assessment of organic acids involved in *Aerococcus anti-Salmonella* activity

Due to the anti-*Salmonella* activity of their CFS, the production of organic acids by *Aerococcus* strains was studied. After 72 h of incubation in MSM, the four *Aerococcus* active CFS (Table 3) were collected and analysed using HPLC with UV detection at 210 nm. Chromatograms of *Aerococcus* CFS were compared with chromatograms of sterile MSM. No production of lactic acid was observed, while acetic acid was produced at concentration ranging from 0.23 to 0.34 g L⁻¹, depending on the strain. Additionally, an unknown molecule was produced and eluted at 9.1 min. However, none of organic acids standards injected were found to correspond (data not shown).

4. Discussion

Classic nutritive media such as MRS, M17, and BHI agar are well-used for spot-on-lawn assays to detect microbial antagonistic activities. BHI agar has the advantage to allow the growth of a large panel of microorganisms thanks to its nutrient-rich composition. For LAB-only screening, MRS agar is commonly used. These non-opaque media are easy to use but their composition is far from that of real matrices encountered during dairy food making processes. It is known that antimicrobial activities revealed when using classic nutritive media can be lost in real dairy matrix conditions.

In this study, a new screening method was developed and applied for the detection of microbial antagonistic activities towards pathogenic bacteria using dairy-like media. The method developed has the advantage of using conditions mimicking semi-soft cheese making process, from milk maturation to cheese ripening steps, in terms of nutritional content for microorganisms, pH and temperature. It also has the advantage of overcoming difficulties associated to opacity of dairy-like media. The method was also designed to manage a large number of isolates in 96-well microplates, therefore cell concentrations of the isolates to be screened were not adjusted when inoculating the first agar layer. The consequence is that the cellular levels of the screened dairy isolates in microplate wells may vary depending on the microbial species or strains investigated, and on the trials. As the anti-*Salmonella* activity of the isolates was confirmed in a second experiment, it was considered as a minor drawback of our method. Additionally, strains belonging to 18 different genera, including fastidious ones (e.g., *Lactobacillus* sp), showed inhibitory activities with this method, suggesting that it was of broad use. Mainly members of the *Actinobacteria* class were not detected as active in this experiment, but some of them exhibited activity toward a *S. Newport* strain (data not shown).

Over the 1450 microbial isolates tested in the current study, most of them were LAB (1004 out of 1450) and especially of the *Lactococcus* genus (37%). Interestingly, a higher number of antagonistic strains were found in “milk” and “cheese” agar compared with classical BHI agar. It appeared that the physicochemical properties of milk and cheese media (e.g., lower pH, and concentrations of citrate, free fatty acids and minerals) were more suitable for revealing the production of inhibitory molecules by this bacterial group. This was consistent with the study of Matevosyan, Bazukyan, and Trchounian (2019a), where LAB antibacterial activities were more important in milk agar than in classic medium such

as MRS. Another study showed that calcium and magnesium ions in combination were involved in the increase in LAB antibacterial activity (Matevosyan et al., 2019a). Besides compositions, microbial antagonistic activities are also highly dependent on culture conditions (Matevosyan, Bazukyan, & Trchounian, 2019b). For example, activities of antimicrobial substances were shown significantly influenced by temperature, NaCl and glucose concentrations (Rohmatussolihat, Lisdiyanti, Yopi, Widayuti, & Sukara, 2018). This corroborates the importance of using media as close as possible to the food matrix for the selection of bioprotective agents that may then still be active when applied to real food processes.

The screening performed against 20 field *Salmonella* strains from different serovars, in the same conditions as those used with the two *Salmonella* reference strains, showed that *Lactococcus* and *Aerococcus* were the major antagonistic genera. None of the 20 field *Salmonella* were resistant to all of the 31 tested isolates. Most isolates were not able to inhibit all *Salmonella* strains in our conditions whatever the serovar. This indicates that the inhibitory activities of the screened isolates were strain-dependent.

LAB, especially *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, are well-known for their antagonistic activities against pathogens (El Kheir et al., 2018; Lindgren & Dobrogosz, 1990) and were confirmed as such in this study. Additionally, some isolates belonging to the *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* and *Weissella* genera exhibited a predictable inhibitory activity. The anti-*Salmonella* activity of a large proportion of LAB isolates belonging to the *Aerococcus* genus was more surprising, as published reports on the antimicrobial potential of this genus are scarce to our knowledge. Although the four investigated *Aerococcus* strains had a similar behaviour toward the *Salmonella* strains, they were probably not clones because they originated from different substrates (air versus raw milk) and from different farms.

CFS were investigated to decipher the mechanisms involved in *Salmonella* inhibition. An inhibitory activity was associated to CFS from isolates grown in MSM, whereas none was found for CFS from CSM. This could be explained by several factors leading to a limited growth of the tested strains and/or to a lower production of inhibitory molecules in CSM than in MSM. Indeed, CSM was incubated at 15 °C whereas MSM was incubated at 30 °C, and CSM had a pH of 6.8 whereas MSM pH was of 6.3. The lactose concentration in CSM was of 20 g L⁻¹ compared with 48.5 g L⁻¹ in MSM, and lactic acid concentration was of 18 g L⁻¹ in CSM and of 1 g L⁻¹ in MSM. This could have impacted the growth of the tested microbial isolates.

It is well documented that most of the LAB inhibition activities are notably related to the production of organic acids, mostly lactic acid (Liu, 2003) but also acetic acid, phenyllactic acid (Gerez, Torres, Font de Valdez, & Rollán, 2013) and other organic acids (Garnier, Torres, Font de Valdez, & Rollán, 2020). Many primary substrates for organic acid production are found in dairy matrices: carbohydrates, amino acids (Stiles, 1996), and unsaturated free fatty acids through epoxide and hydroperoxide formation (Molimard & Spinnler, 1996). In this study, all the *Lactococcus* sp. tested showed an important production of lactic acid and produced also acetic acid, as reported in other studies (Rössland, Langsrud, Granum, & Sørhaug, 2005; Özcelik, Kuley, & Özogul, 2016).

Interestingly, *Aerococcus* strains were not associated with the production of lactic acid. Mechanisms of action were different for the four *Aerococcus* strains mainly investigated in the current study, compared with the other LAB strains. Indeed, the *Aerococcus* antagonist activity seemed to be related, at least in part, to the production of organic acids (acetic acid) and hydrogen peroxide. This is consistent with a previous study showing a production of

hydrogen peroxide by this genera (Stepanskyi et al., 2017). In the *Aerococcus* genus, the decarboxylation of pyruvate due to the action of a pyruvate oxidase allows the formation of hydrogen peroxide through the reduction of dioxygen in *Aerococcus viridans* (Yanze Kontchou & Blondeau, 1990). The enzyme glycerophosphate-oxidase (GPO), isolated from *A. viridans*, also contributes to the formation of hydrogen peroxide (Streitenberger, López-Mas, Sánchez-Ferrer, & García-Carmona, 2001). This enzyme has been described in other LAB genera such as: *Leuconostoc* (Emi, Kojima, & Ando, 1984), *Pediococcus* (Süchová, Demnerová, Bond, & Králová, 1992) and *Streptococcus* (Esders & Michrina, 1979). In this study, the concentration of hydrogen peroxide recorded in CFS ranged between 30 and 100 mg L⁻¹. Such concentrations are similar and potentially higher than those recorded for strains belonging to *Lactobacillus acidophilus*, and which ranged between 1.7 and 50 mg L⁻¹ (Hertzberger et al., 2014; Strus, Brzychczy-Wioch, Gosiewski, Kochan, & Heczko, 2006).

An unknown molecule eluted at 9.1 min, and which was not produced by the other tested strains, could be related to the observed inhibition. The identification and assessment of the potential anti-*Salmonella* activity of this molecule remain to be performed.

The *Aerococcus* genus is composed of eight species: *Aerococcus christensenii*, *Aerococcus sanguinicola*, *Aerococcus suis*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus urinaehominis*, *A. viridans*, *Aerococcus urinaeequi* and *Aerococcus vaginalis* (Tohno et al., 2014). Some species of this genus, such as *A. viridans*, appear to be strongly associated to dairy environments. They have been found in air, soil, and dairy environments (Ruoff, 2011). *Aerococcus* genus has frequently been detected as a dominant flora in raw milk samples collected on Normandy dairy farms (Mallet, 2012). *Aerococcaceae* was also the major taxon found in milk and air dust samples collected on farms located in Okayama and Hiroshima (Japan) using automatic milking systems (Wu et al., 2019). In sixteen French farms, the *Aerococcus* genus was also found in milk, ambient air, air from the milking area, dust and on teat skin (Vacheyrou et al., 2011).

In another study, the bacterial diversity of cows' teat skin was investigated. Among the major phylum encountered (Firmicutes) *Aerococcus* sp., and especially *A. viridans*, were found (Verdier-Metz et al., 2012). The microbial diversity in bovine faeces was also investigated to evaluate their importance as microorganisms' source (Kagkli, Vancanneyt, Hill, Vandamme, & Cogan, 2007). *A. viridans* was identified in 62 of the 76 samples collected from one farm, and accounted for 83% of the total isolates.

The *Aerococcus* genus has been detected in raw goat milk and in Pélardon cheese, a raw goat milk cheese (Penland et al., 2018). In Mexican cheeses, *Aerococcus* sp. was found in high proportion in Cotija (a Mexican handcrafted product made from raw cow milk) and Adobera-de-mesa cheeses (Murugesan et al., 2018). In Cotija cheese, this bacterium was detected at the surface and in the core of the product (Chombo-Morales, Kirchmayr, Gschaedler, Lugo-Cervantes, & Villanueva-Rodríguez, 2016). In this study all strains belonged to *A. urinaeequi*.

Among *Aerococcus* species, some are known to be involved in rare human clinical cases, especially *A. urinae* and *A. sanguinicola*, associated to urinary tract infections. However, regarding species described in milk and cheese (*A. viridans/urinaeequi*), no case of contamination and no clinical case linked to the consumption of dairy products have been reported so far.

Because of the anti-*Salmonella* activity of *Aerococcus* strains and their natural presence in dairy products, this genus appears to be an unexpected promising candidate to control *Salmonella* in dairy products. Further investigations will be conducted to determine if the production of hydrogen peroxide can potentially affect the growth of dairy starter cultures.

5. Conclusions

In this study, we developed a new agar-based screening method allowing the detection of microbial antagonistic activities against *Salmonella* in dairy-like opaque media. It allows the screening of a large number of isolates at the same time. Starting from microbial cultures grown in Deepwell®, this screening method can be used to inoculate simultaneously diverse opaque media incubated in different conditions, mimicking various physicochemical and nutritional conditions encountered during the processing steps of a food matrix. This is of particular interest for the dairy industry, as this method allows a screening adapted to different steps of cheese making processes. This method may also be transferred for the screening of microbial isolates against other pathogens than *Salmonella*.

While some isolates were able to inhibit all the tested *Salmonella* strains, the inhibition potential was found, as expected, to be essentially strain-dependent. Combinations of antagonistic isolates with various mechanisms of anti-*Salmonella* actions should be considered for insuring a protection from the beginning to the end of the cheese making process. Associations of strains displaying different inhibition mechanisms could bring a larger spectra of *Salmonella* inhibition and prevent the emergence of resistance mechanisms from the pathogens.

From this study, the *Aerococcus* genus, and especially *A. urinaeequi*, seems to be a promising source of bioprotective strains to be used in addition to dairy starters. Compared with other LAB genera, little is known about *Aerococcus*, and especially about *Aerococcus* species encountered in dairy environments. Therefore, further investigations dealing with antibiotic resistance, the production of biogenic amines and the presence of virulence factors need to be evaluated before further consideration of their use as protective cultures.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work is part of the CESam project, co-funded by Normandy County Council and the European Union in the framework of the ERDF-ESF operational programme 2014–2020. It was also supported by a CIFRE grant from the “Association Nationale Recherche Technologie”, and got the VALORIAL label.

References

- Abraham, E. P., Chain, E., Fletcher, C. M., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., et al. (1941). Further observations on penicillin. *Lancet*, 238, 177–189.
- Ben Said, L., Gaudreau, H., Dallaire, L., Tessier, M., & Fliss, I. (2019). Bioprotective culture: A new generation of food additives for the preservation of food quality and safety. *Industrial Biotechnology*, 15, 138–147.
- Carnio, M. C., Hölzel, A., Rudolf, M., Henle, T., Jung, G., & Scherer, S. (2000). The macrocyclic peptide antibiotic micrococin P1 is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2378–2384.
- Casabianca, F., & Jeanneaux, P. (2020). *Le lait cru: Créateur de valeurs ajoutées et partagées? Colloq. Fromag. Au lait cru entre risques bénéfiques divers. Au Cœur Débat CNAOL, INAO.*
- Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E., & Villanueva-Rodríguez, S. (2016). Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *IWT - Food Science & Technology*, 65, 1153–1161.

- CLSI. (2004). *Quality control for commercially prepared microbiological culture media* (3rd ed.). Wayne, PA: USA Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Daly, K. M., Upton, M., Sandiford, S. K., Draper, L. A., Wescombe, P. A., Jack, R. W., et al. (2010). Production of the Bsa lantibiotic by community-acquired *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Bacteriology*, *192*, 1131–1142.
- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J., & Gueguen, M. (1998). Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 800–803.
- EFSA. (2019). *The European union one health 2018 zoonoses report*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- El Kheir, S. M., Cherrat, L., Awussi, A. A., Ramia, N. E., Taha, S., Rahman, A., et al. (2018). High-throughput identification of candidate strains for biopreservation by using bioluminescent *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, Article 1883.
- Emi, S., Kojima, Y., & Ando, M. (1984). *Process for producing α -glycerophosphate oxidase*. US Patent No. US4463095A.
- Eppert, I., Valdés-Stauber, N., Götz, H., Busse, M., & Scherer, S. (1997). Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium lines* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 4812–4817.
- Erders, T. W., & Michrina, C. A. (1979). Purification and properties of l-alpha-glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faecium* ATCC 12755. *Journal of Biological Chemistry*, *254*, 2710–2715.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, *120*, 51–70.
- Garnier, L., Penland, M., Thierry, A., Maillard, M.-B., Jardin, J., Coton, M., et al. (2020). Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *International Journal of Food Microbiology*, *322*, Article 108574.
- Gerez, C. L., Torres, M. J., Font de Valdez, G., & Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, *64*, 231–237.
- Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B., & Scherer, S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 313–318.
- Guichard, H., & Bonnarne, P. (2005). Development and validation of a plate technique for screening of microorganisms that produce volatile sulfur compounds. *Analytical Biochemistry*, *338*, 299–305.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., et al. (2014). H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: A central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*, 2229–2239.
- IDF. (2016). *IDF factsheet - raw milk cheeses*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Jourdan-da Silva, N., Fabre, L., Robinson, E., Fournet, N., Nisavanh, A., Bruyand, M., et al. (2018). Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveillance*, *23*, Article 852.
- Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., & Cogan, T. M. (2007). *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology*, *114*, 243–251.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation. A review. *Microorganisms*, *5*, Article 37.
- Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiological Reviews*, *7*, 149–163.
- Liu, S.-Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *83*, 115–131.
- Mallet, A. (2012). Diversité microbienne des laits crus : États des lieux, réservoirs et expression en transformation fromagère: Exemple de Camembert de Normandie. Thèse. Caen. France: Université de Caen.
- Mansour, S., Beckerich, J. M., & Bonnarne, P. (2008). Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 6505–6512.
- Matevosyan, L., Bazukyan, I., & Trchounian, A. (2019a). Comparative analysis of the effect of Ca and Mg ions on antibacterial activity of lactic acid bacteria isolates and their associations depending on cultivation conditions. *AMB Express*, *9*, Article 32.
- Matevosyan, L., Bazukyan, I., & Trchounian, A. (2019b). Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC Microbiology*, *19*, Article 102.
- Miceli de Farias, F., dos Santos Nascimento, J., Cabral da Silva Santos, O., & de Freire Bastos, do C. M. (2019). Study of the effectiveness of staphylococci in biopreservation of Minas fresh (Frescal) cheese with a reduced sodium content. *International Journal of Food Microbiology*, *304*, 19–31.
- Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996). Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, *79*, 169–184.
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., et al. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, *177*, 136–154.
- Murugesan, S., Reyes-Mata, M. P., Nirmalkar, K., Chavez-Carbajal, A., Juárez-Hernández, J. I., Torres-Gómez, R. E., et al. (2018). Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing. *Food Research International*, *113*, 371–381.
- Özcelik, S., Kuley, E., & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Science & Technology*, *73*, 536–542.
- Penland, M., Coton, M., Mounier, J., Parayre, S., Coton, E., Falentin, H., et al. (2018). *Microbial diversity of Pélardon, an artisanal raw goat milk cheese*. Congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM. p. page np 14).
- Pham, N.-P., Layec, S., Dugat-Bony, E., Vidal, M., Irlinger, F., & Monnet, C. (2017). Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: Insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics*, *18*, Article 955.
- Rohmatussolihat, R., Lisdiyanti, P., Yopi, Y., Widyastuti, Y., & Sukara, E. (2018). Medium optimization for antimicrobial production by newly screened lactic acid bacteria. *Annales Bogorieneses*, *22*, 1–11.
- Rössland, E., Langsrud, T., Granum, P. E., & Sørhaug, T. (2005). Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, *98*, 193–200.
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, *79*, 3–16.
- Ruoff, K. L. (2011). *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci. In J. Jørgensen, M. Pfaller, K. Carroll, G. Funke, M. Landry, S. Richter, et al. (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (10th ed., pp. 365–376). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Sharma, D. (2016). *Biosurfactant in food*. Berlin, Germany: Springer.
- Stepanskyi, D., Kremenchutsky, G., Chuyko, V., Koshova, I., Khomiak, O., & Krushynska, T. (2017). Hydrogen peroxide production activity and adhesive properties of aerococci, isolated in women. *Annals of the Mechnikov Institute*, *2*, 53–56.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*, 331–345.
- Streitenberger, S., López-Mas, J., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (2001). Highly efficient *Aerococcus viridans* L- α -glycerophosphate oxidase production in the presence of H₂O₂-decomposing agent: Purification and kinetic characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*, 329–333.
- Strus, M., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T., Kochan, P., & Heczko, P. B. (2006). The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *48*, 56–63.
- Süchová, M., Demnerová, K., Bond, K., & Králová, B. (1992). Production of l- α -glycerophosphate oxidase by lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, *14*, 917–922.
- Tohno, M., Kitahara, M., Matsuyama, S., Kimura, K., Ohkuma, M., & Tajima, K. (2014). *Aerococcus vaginalis* sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of *Aerococcus suis*, *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaequei*, *Aerococcus urinaehominis*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii* and *Aerococcus sanguinicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 1229–1236.
- Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., & Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*, *146*, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033>
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., et al. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*, 326–333.
- Walter, V., Sylđatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In R. Sen (Ed.), *Vol. 672. Advances in experimental medicine and biology* (pp. 1–13). New York, NY, USA: Springer.
- Wu, H., Nguyen, Q. D., Tran, T. T. M., Tang, M. T., Tsuruta, T., & Nishino, N. (2019). Rumen fluid, feces, milk, water, feed, airborne dust, and bedding microbiota in dairy farms managed by automatic milking systems. *Animal Science Journal*, *90*, 445–452.
- Yanze Kontchou, C., & Blondeau, R. (1990). Isolation and characterization of hydrogen peroxide producing *Aerococcus* sp. from soil samples. *FEMS Microbiology Letters*, *68*, 323–328.