



Inhibition de *L. monocytogenes* par des consortia microbiens dans des fromages modèles de type pâte pressée non cuite

*Callon C., Didienne R., Lavigne R., Retureau E., Veisseire P., Gay Perret P.,
Pagnier R., Montel M.C.*



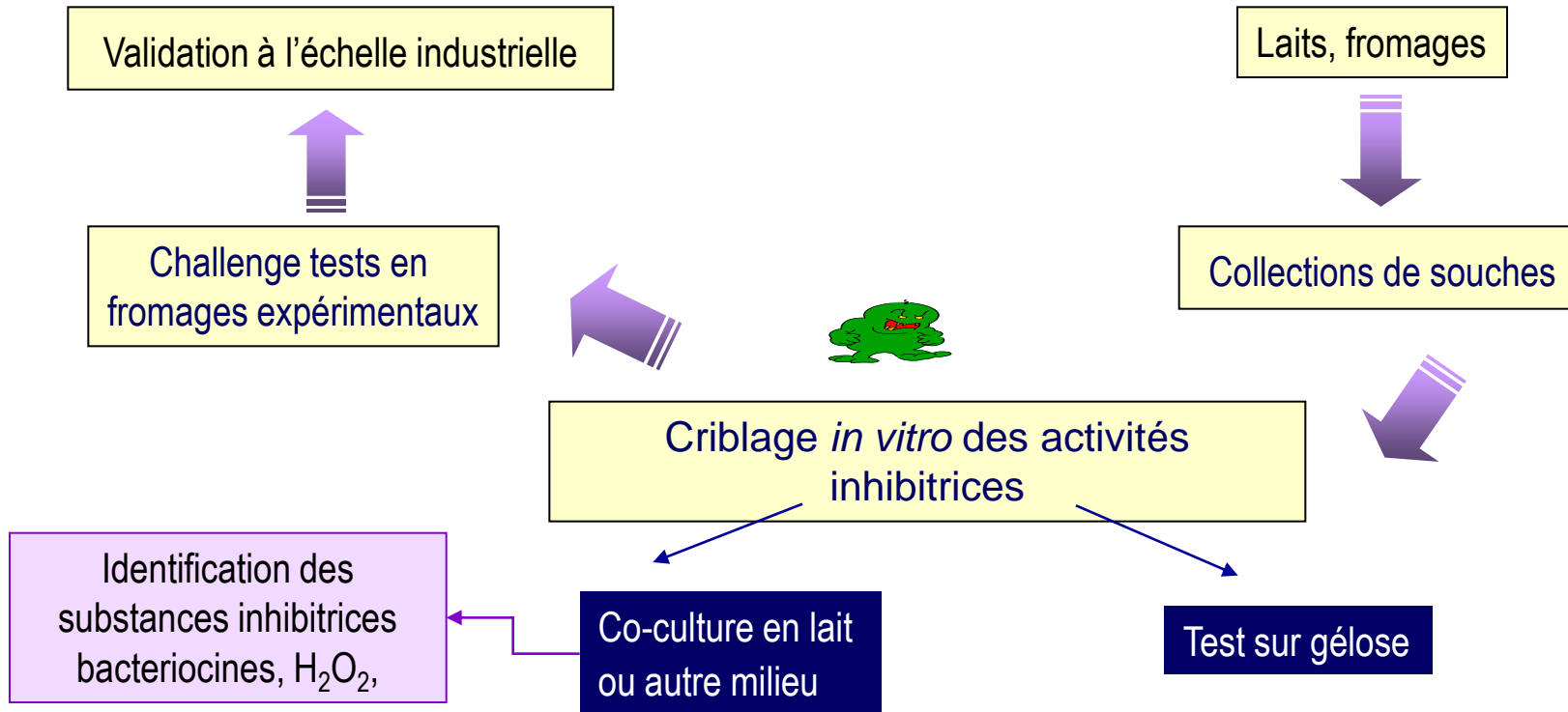
Sélection de **consortia** inhibiteurs de *Listeria monocytogenes* par une nouvelle stratégie de simplification

Consortium = ensemble de microorganismes différents interagissant dans un écosystème donné

Schéma de méthodologie de sélection de ferments inhibiteurs



Méthode classique: sélection de souches ou de métabolites inhibiteurs



Méthode longue et fastidieuse

Souches inhibitrices *in vitro* pas toujours inhibitrices en fromage



Méthode d'écologie : sélection en fromages modèles à partir simplification de communautés microbiennes ayant une activité antilisteria

Proposition de consortium
Conseil en production de lait et
affinage des fromages

Criblage de laits, ou croûtes de fromages
en fromages expérimentaux



Test de consortia microbiens reconstitués et
simplifiés en fromages expérimentaux

Sélection des consortia microbiens les plus
inhibiteurs



Identification de la flore microbienne des
consortia



✓ Méthodologie d'écologie déjà appliquée dans de nombreuses études (*Maoz et al, 2003, Mayr et al, 2004, Roth et al, 2010...*)

Mais

- ✓ Peu de connaissances sur les populations microbiennes impliquées
- ✓ Consortia complexes : peu d'études de simplification de ces consortia (*Monnet et al, 2009; Imram et al, 2011*)



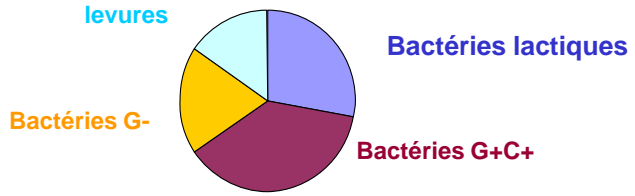
Application de l'approche écologique à la simplification d'un consortium inhibiteur de *L. monocytogenes* en pâte

Fromages pâte pressée non cuite (PPNC) type St-Nectaire

Simplification d'un consortium inhibiteur pâte fromage PPNC



Consortium complexe (lait cru)
32 espèces 4 groupes microbiens



Inhibition
L. monocytogenes ***

**Simplifications
omissions successives**
groupes, espèces

Validation
fromages expérimentaux
lait pasteurisé

Consortium complexe de 14 souches
réparties en 2 groupes

Inhibition
L. monocytogenes ***

Groupe A: les bactéries lactiques
→ 7 souches

Groupe B: les bactéries Gram + catalase +
→ 7 souches

Choix de 5 souches parmi A et B,
par rapport à leur **production d'acides organiques**
(lactate, acétate)
et **métabolisme du citrate**

3 souches de bactéries lactiques

2 souches bactéries Gram + catalase +

- Ln citreum*
- Ln pseudomesenteroides*
- Lb plantarum*

- Mc. caseolyticus*
- S. equorum*

Consortium complexe de 5 souches (C5s)

Inhibition
L. monocytogenes ***



Consortium complexe de 5 souches (C5s)



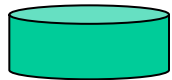
Tests en caillés modèles de 31 combinaisons de 1 à 5 souches

**Sélection des 8 consortia les plus inhibiteurs
en caillés modèles**

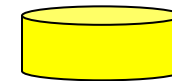
Validation en fromages PPNC lait pasteurisé
(Ferment thermophile)



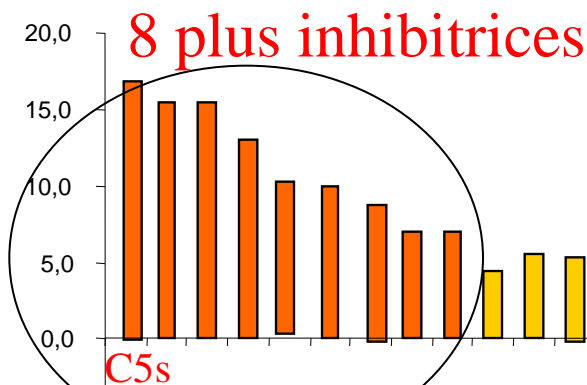
**Sélection du consortium le plus inhibiteur
4 souches (C4s)**



Fromages
lait pasteurisé

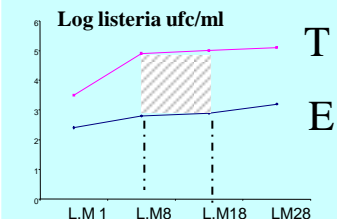


Fromages
lait cru



Aire d'inhibition (18-8j)
 des 31 combinaisons de
 souches

Inhibition exprimée en AI
 = aire d'inhibition :



Associations 4 souches
 3 souches
 2 souches

Non inhibitrices

Souches seules
 Associations 3 souches
 2 souches

- Inhibition dépend de l'association des souches
- Forte synergie entre souches bactéries lactique et *Macrocooccus caseolyticus*
- Pas de rôle de *Staphylococcus equorum*

Validation en fromages expérimentaux



Fabrications de fromages 450g
au lait pasteurisé
inoculés avec *St. thermophilus* seul
Ou avec les **8 combinaisons les plus inhibitrices**:



Control +
C5s

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

2 associations 4 souches

C4s1

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

C4s2

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

3 associations 3 souches

C3s1

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

C3s2

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

C3s3

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

3 associations 2 souches

C2s1

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

C2s2

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

C2s3

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

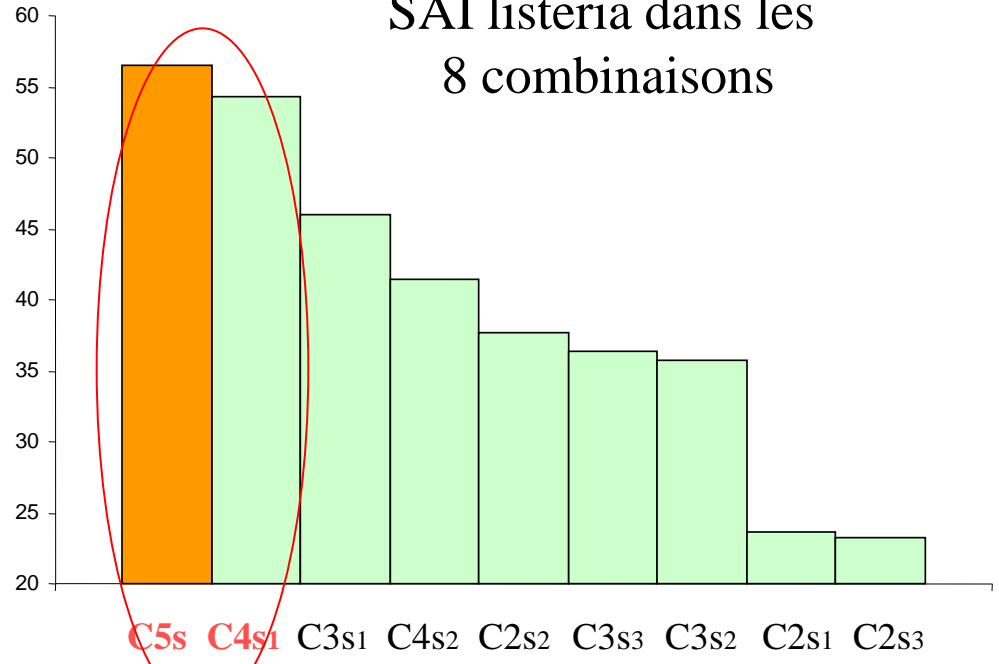
Control -
C0s

Lb. pl
Ln. cit
Ln. mes
Mc. cas
S. eq

Inhibition de *Listeria* dans les fromages PPNC



SAI listeria dans les 8 combinaisons



$SAI = \sum AI$ à tous les temps

Plus forte inhibition dans la pâte des fromages inoculés avec

les consortia **C5s** **C4s**

- Lb. pl*
- Ln. cit*
- Ln. mes*
- Mc. cas*
- S. eq*

- Lb. pl*
- Ln. cit*
- Ln. mes*
- Mc. cas*
- S. eq*

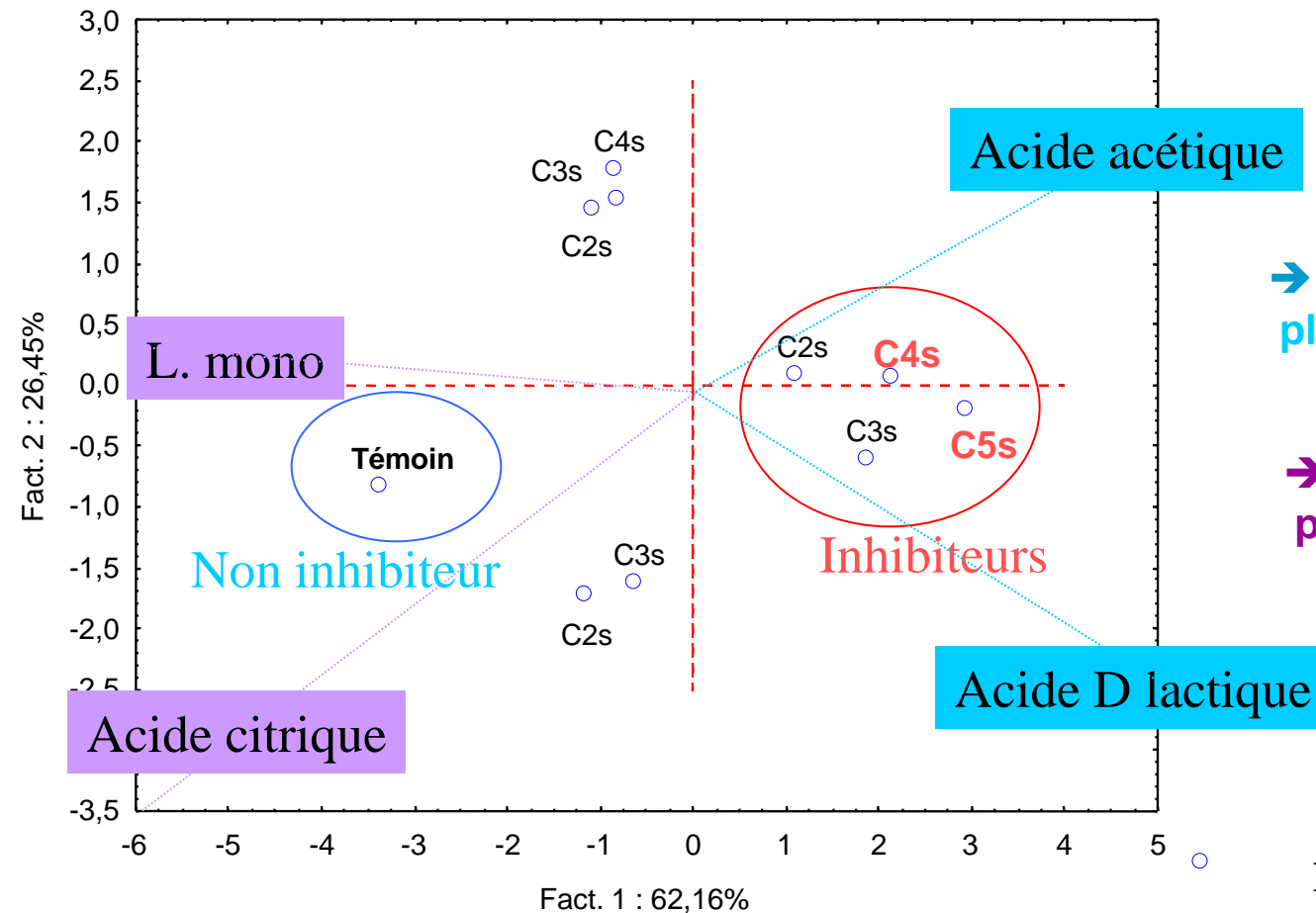


3 Log d'inhibition de *L. monocytogenes*

Teneurs en acides des fromages PPNC



Discrimination des fromages par analyse en composantes principales des acides



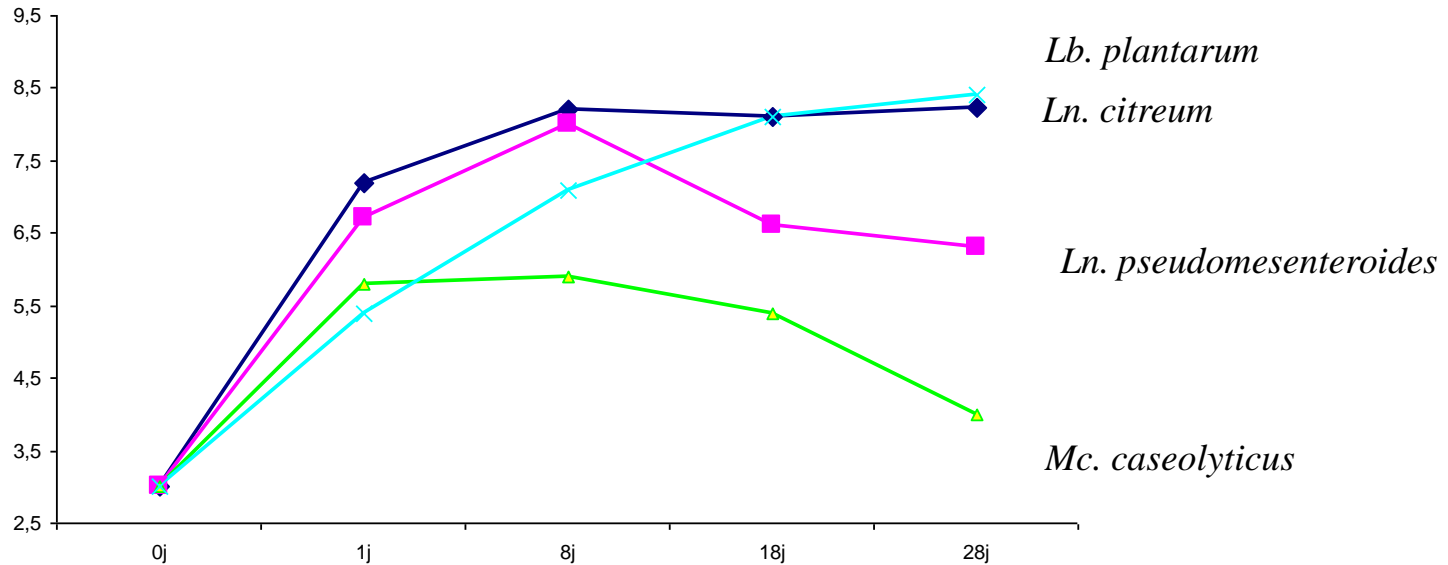
→ Acides lactique et acétique plus élevés dans C5s et C4s

→ Acide citrique plus élevés dans le témoin

Pas de différences de pH entre les fromages



Fromage C4s



- Dominance de *Lb. plantarum* et *Ln. citreum* : niveau max : 8,4 Log
- Diminution de *Ln. pseudomesenteroides* après 8j
- Sous dominance et décroissance en fin d'affinage de *Mc. caseolyticus* (niveau max à 8j : 5.2)

Application lait cru - lait pasteurisé



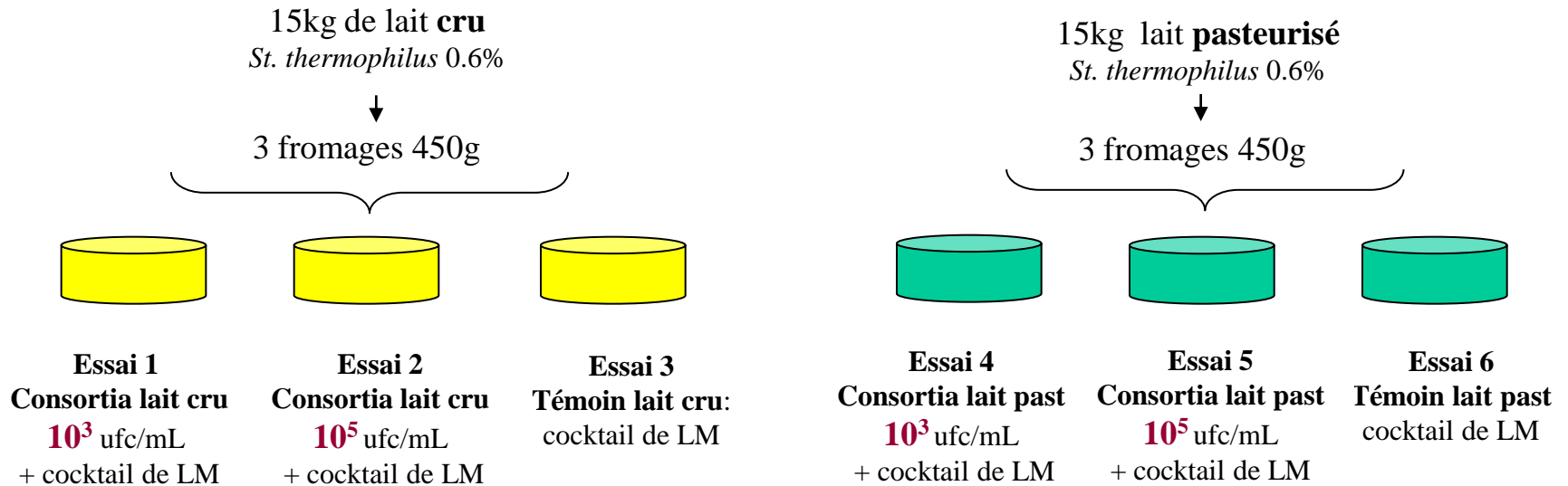
Objectifs :

Evaluer la capacité inhibitrice du consortium **C4s** (*Lb. plant*, *Ln cit*, *Ln mes*, *M. caseol*) vis-à-vis d'un cocktail de 5 souches différentes de listeria (5-10 ufc/25mL)

en fonction :

- du type de lait (cru versus pasteurisé)
- de la concentration des souches du consortium (10^3 - 10^5 ufc/mL)

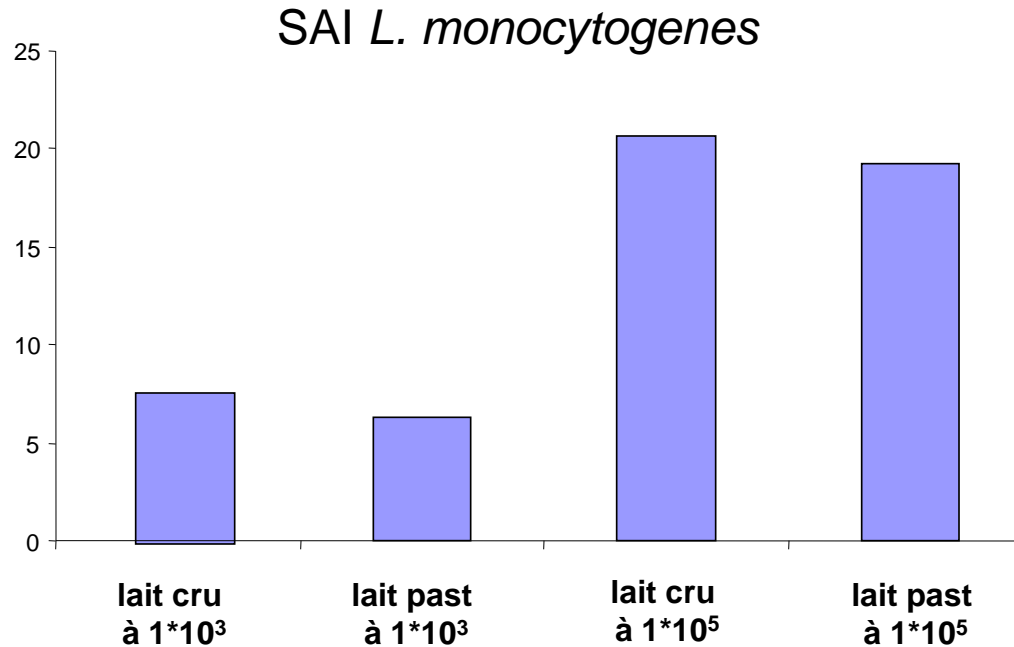
Protocole :



Inhibition Listeria: lait cru-lait pasteurisé



SAI = Σ AI à tous les temps



➡ **Pas d'effet lait** : consortium C4s inhibiteur en lait pasteurisé et en lait cru

➡ **Effet concentration du consortium**: inhibition plus forte à 10^5 qu'à 10^3 dans lait cru et pasteurisé

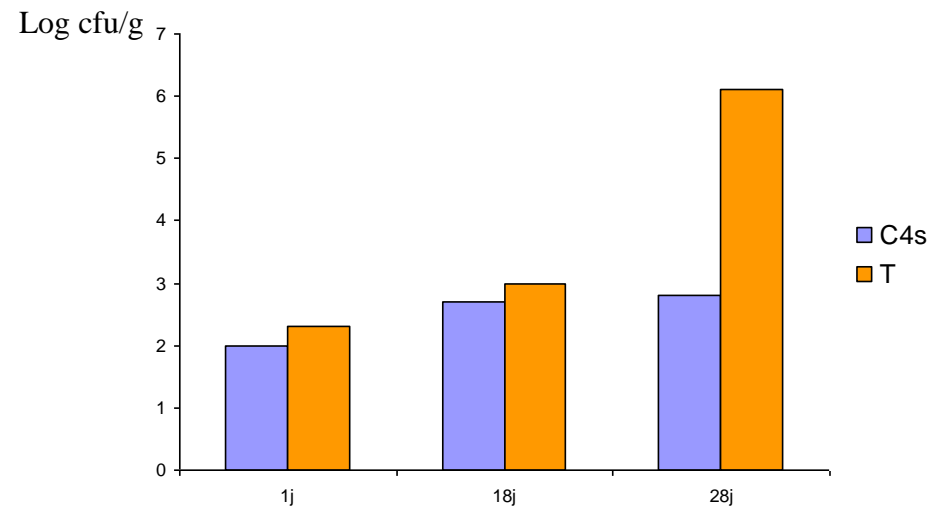
➡ Consortium C4s inhibiteur sur mélange de 5 souches de Listeria

Inhibition *Listeria*: lait cru naturellement contaminé



Fabrications de fromages
au lait cru naturellement contaminé en *Listeria* (10 ufc/ml)
inoculé avec ferment MY800 (témoin)
ou MY800 + consortia inhibiteur C4s (10³ ufc/ml) (essai)

Croissance *Listeria*
dans essai et témoin



3 log d'inhibition de *Listeria* par le
Consortium C4s en fin d'affinage

⇒ Validation des capacités inhibitrices
du consortium C4s sur du lait naturellement
contaminé



Consortium pâte

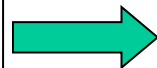
Lb. plantarum
Ln pseudomesenteroides
Ln citreum
Mc. caseolyticus



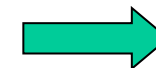
- ➔ Optimisation des conditions de pré-cultures, d'utilisation et de production du consortium
- ➔ Intégration des facteurs abiotiques (conditions d'affinage : température et humidité relative) jouant sur l'inhibition

Consortium croûte

Leuconostoc - Lactobacillus
Carnobacterium mobile
Marinilactobacilli psychrotolerans
Brachybacterium tyrofermentans
Brochothrix thermosphacta
Leucobacter
Arthrobacter



Inhibition
L. monocytogenes



**Simplification
à réaliser**

Conclusions



- ➔ Sélection de ferments inhibiteurs en plusieurs étapes
 - ❖ 1ère étape : simplification de communautés par omission
 - ❖ 2ème étape : connaissance de la nature de l'inhibition
 - ➔ orientation vers la recherche des potentialités des souches (exple : production des acides)

- ➔ Méthode transposable à la sélection de ferments aromatiques

- ➔ Nécessité d'une certaine complexité pour l'inhibition: souches individuelles non inhibitrices
 - ❖ Lait cru inhibiteur
 - ❖ Plusieurs consortia de compositions différentes = inhibition en pâte et croûte

- ➔ Consortium de 4 espèces proposé aux filières pour une validation à grande échelle