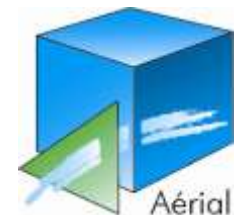




Diversité des **bactéries à Gram négatif** isolées des laits et fromages : espèces et facteurs de risque *in vitro*

Monika COTON, Céline DELBÈS-PAUS, Françoise IRLINGER,
Nathalie DESMASURES, Anne LE FLECHE, Valérie STAHL, Marie-
Christine MONTEL et Emmanuel COTON





Bactéries à Gram négatif omniprésentes dans l'environnement laitier

- ➔ flore prairiale
- ➔ trayons
- ➔ machine à traire
- ➔ aliments ...

Identité et diversité méconnues

Risques associés à ces bactéries

(amines biogènes, antibiorésistances, cas cliniques répertoriés)

Quelles incidences dans les fromages ?

CONTEXTE (diversité)



une 20aine
d'espèces
citées
(alimentaire)

Pseudomonas

Flavobacterium

E. coli pathogènes

E. coli

Serratia

Salmonella

Yersinia enterocolitica
pathogènes

Hafnia alvei

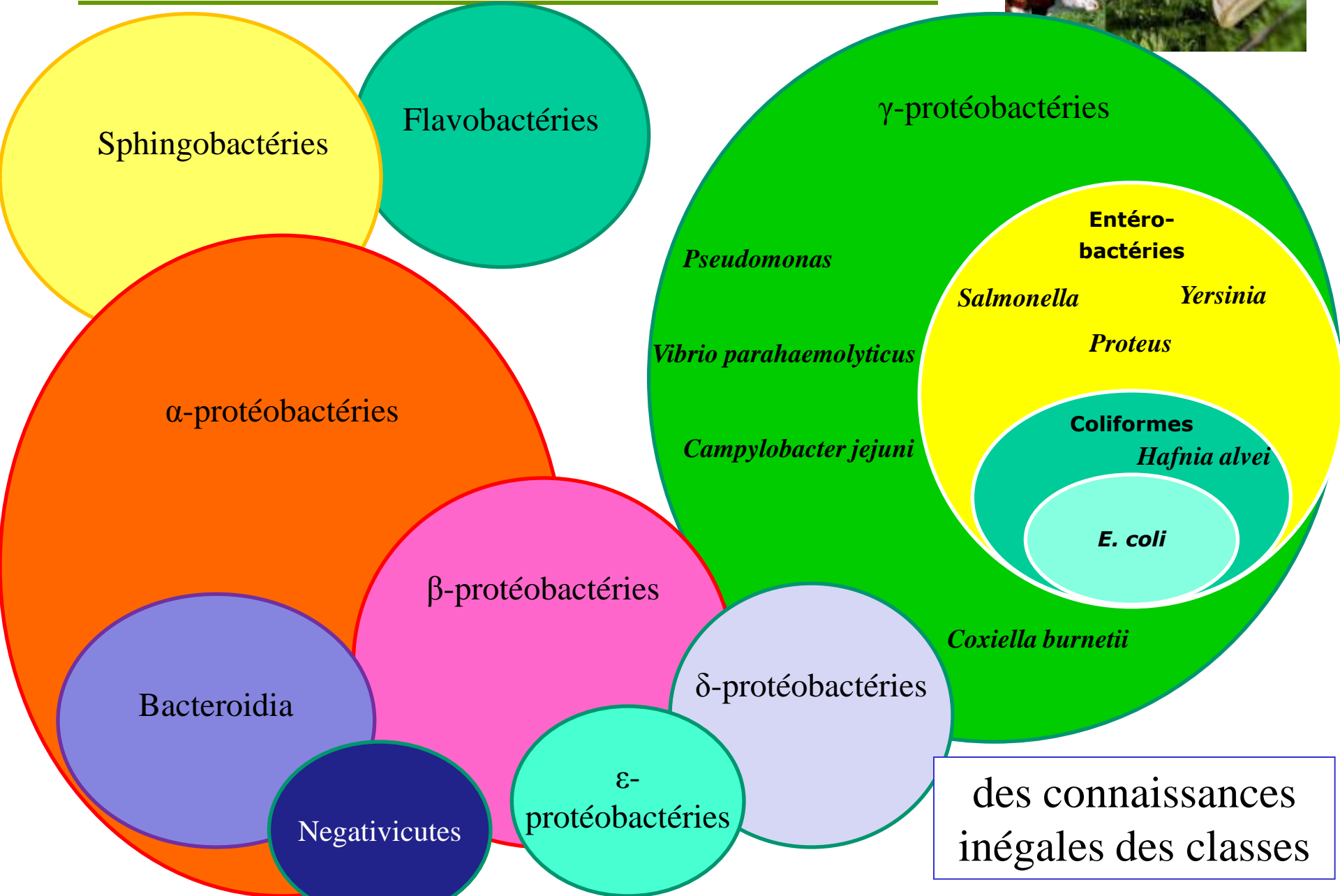
Campylobacter
jejuni

Coxiella burnetii

Vibrio
parahaemolyticus

Plus de 4000
espèces de bactéries
à Gram négatif
répertoriées

CONTEXTE (suite)

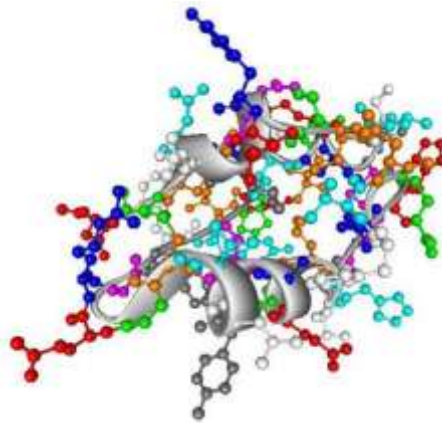


des connaissances
inégaux des classes

CONTEXTE (risques)



Protéines



Protéolyse

Certains poissons et dérivés, aliments
ou boissons fermentés

Acides aminés



Amines biogènes

Certaines bactéries lactiques
Certaines bactéries à Gram négatif



rougeur facio-cervicale,
éruption cutanée, œdème du
visage, ↗ sécrétions
gastriques, palpitations
cardiaques, migraine ...

Consommation d'aliments à forte teneur en
amines biogènes ➔ conséquences toxicologiques
possibles, selon sensibilité du sujet



CONTEXTE (suite)



Histamine
Tyramine

**Principales amines biogènes
associées à des empoisonnements**

Putrescine
Cadavérine
 β -phényléthylamine

**Principales amines biogènes
pouvant être détectées dans les
fromages**

Tryptamine
Spermidine
Spermine

Concentrations limites dans les aliments
. CE 2073/2005 : histamine 100-200 mg/kg pour certains poissons,
. Recommandations : boissons alcoolisées histamine 8-20 mg/l, tyramine 25-40 mg, phényléthylamine 3 mg/l (Spano et al, 2010)

OBJECTIF



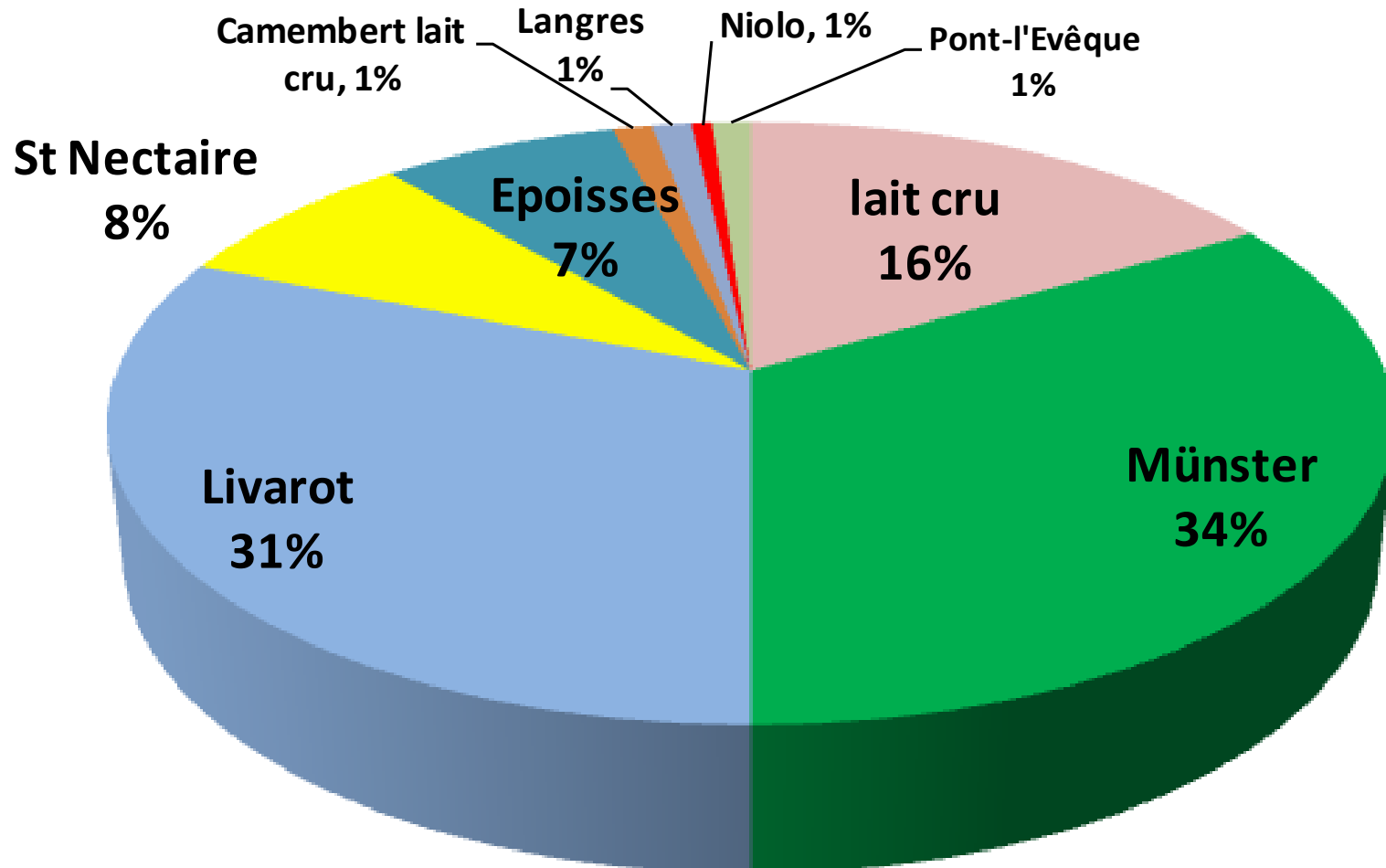
Faire un état des lieux de la **diversité** des **bactéries à Gram négatif** isolées de laits et de fromages (PPNC et pâtes molles)

Évaluer la résistance à divers antibiotiques (cf. présentation 2010, adhésion, toxicité modèle animal)

Évaluer la **capacité à produire des amines biogènes** en milieu de laboratoire

Sélectionner des isolats représentatifs pour une évaluation des bénéfices/risques en fromages

METHODOLOGIE



**Constitution à partir de collections existantes
d'un ensemble de **173 isolats****



Identification des isolats : séquençage
ADN (ADNr 16S et/ou *rpoB*)



Etude de la production d'amines biogènes

- ➔ Criblage des 173 isolats / histamine, tyramine, cadavérine, putrescine (analyse qualitative) – 25°C, 1-5 j
- ➔ Dosage (HPLC) pour 55 isolats de la production de 11 amines biogènes : Histamine, Tyramine, Cadavérine, Putrescine, Tryptamine, Phényléthylamine, Isoamylamine. Methylamine, Ethylamine, Spermine, Spermidine



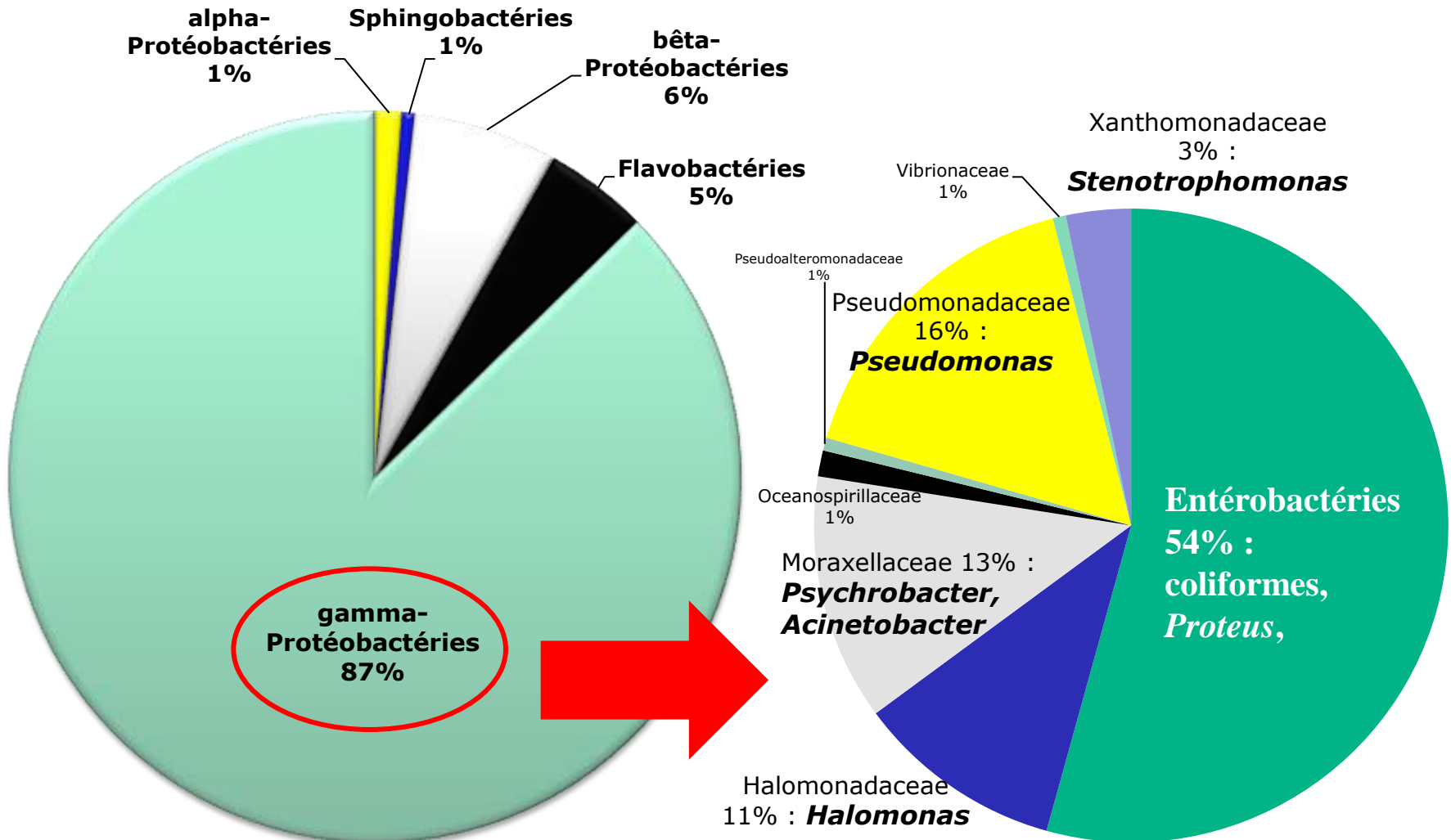
Diversité des bactéries à Gram négatif isolées des laits et des fromages



Large biodiversité



26 genres et 68 espèces

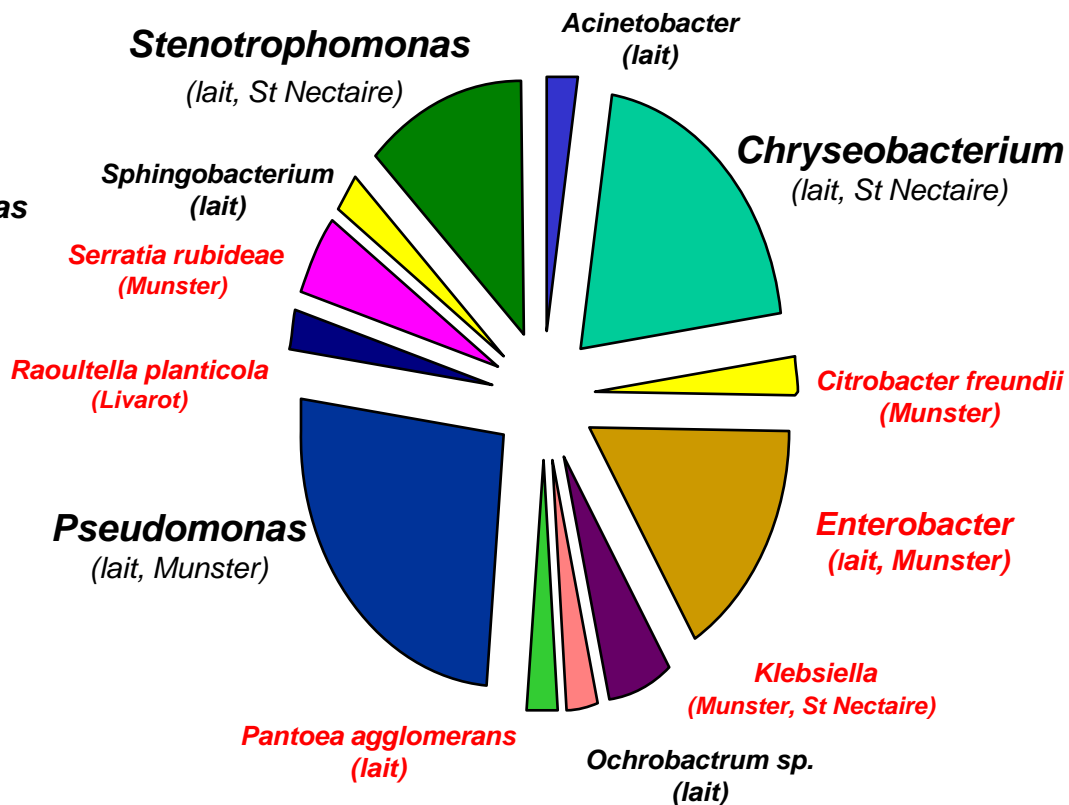
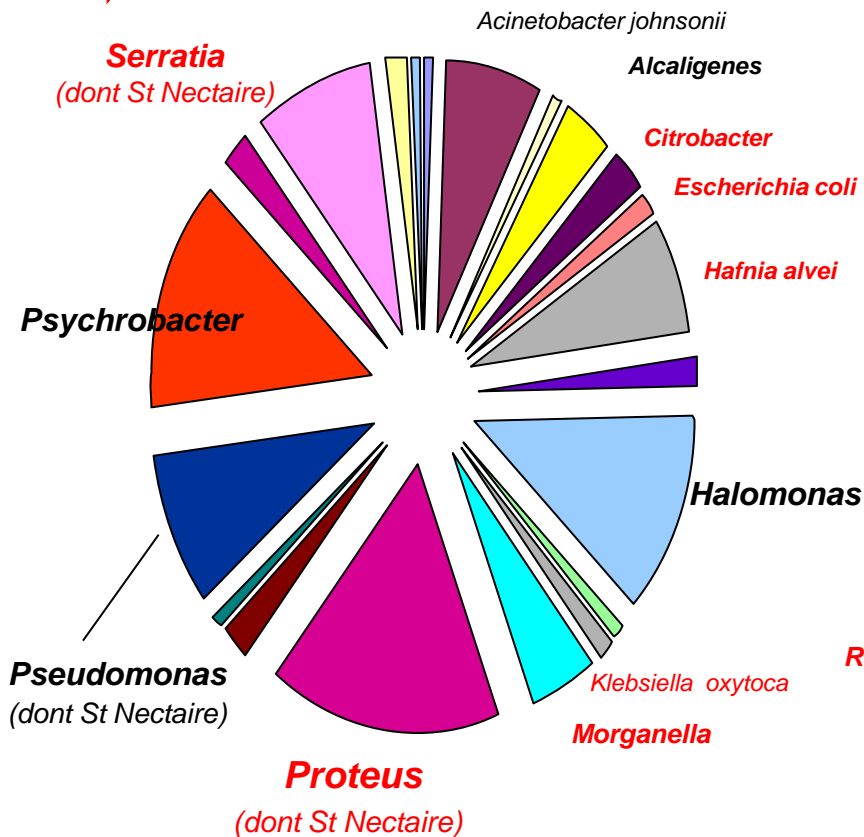




Genres/espèces dominants différents

lait/cœur vs surface

Diversité dans le lait et la pâte de fromages



Diversité en surface de fromages

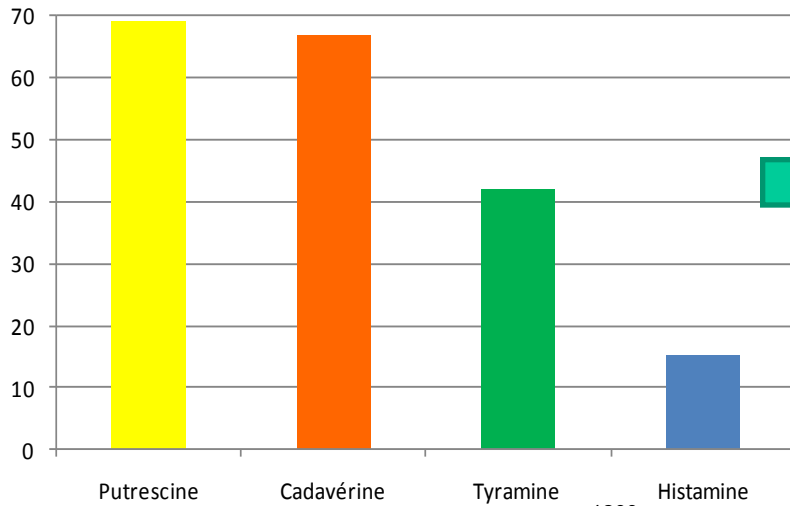


Bactéries à Gram négatif isolées des laits et des fromages : facteurs de risque *in vitro*

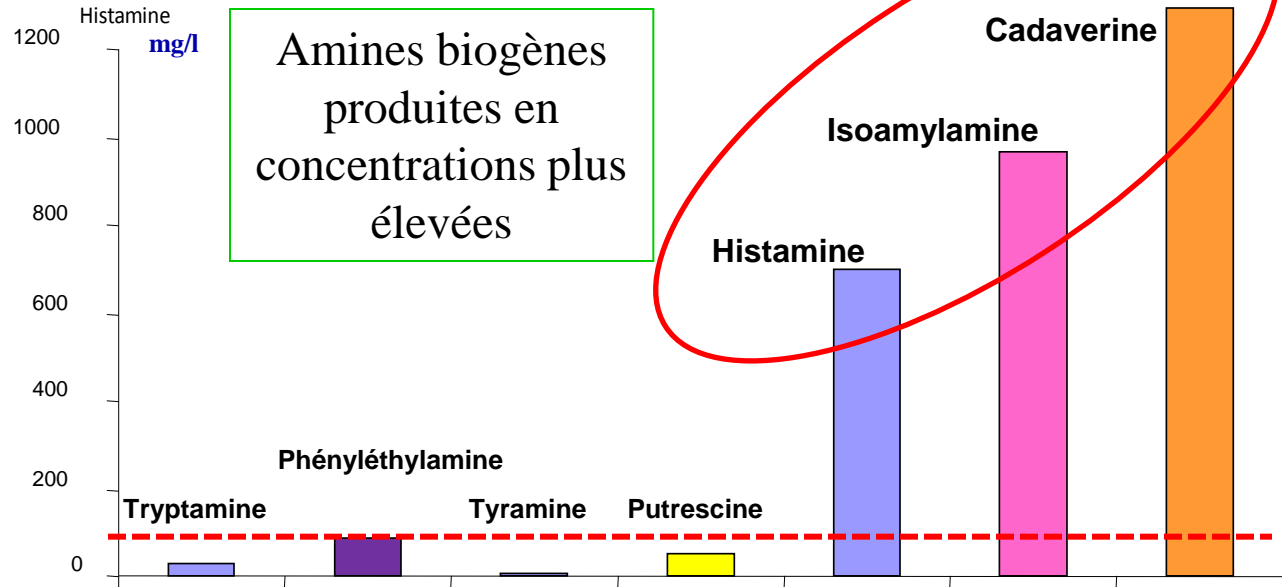
Facteurs de risque *in vitro* :



Production d'amines biogènes en milieu de laboratoire : analyse qualitative



111 isolats (64%)
potentiellement producteurs



Amines biogènes
produites en
concentrations plus
élevées



Production d'amines biogènes en milieu de laboratoire : analyse quantitative

	Classe 1 (12) isolats	Classe 2 (19 isolats)	Classe 3 (27 isolats)
	<i>Lb. saerimneri</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Hafnia alvei</i> 1 <i>Halomonas sp. nov.</i> <i>Halomonas venusta</i> (2) <i>Morganella morganii</i> (3) <i>Providencia heimbachae</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia sp. (close S. grimesii)</i>	<i>Chryseobacterium shigense</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> (4) <i>Hafnia alvei</i> 2 <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas lundensis</i> <i>Pseudomonas grp putida</i> (2) <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Psychrobacter celer</i> <i>Raoultella planticola</i> <i>Serratia grimesii</i> <i>Serratia marescens</i> <i>Serratia proteomaculans</i> <i>Sphingobacterium sp. (close S. faecium)</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2)	<i>Chryseobacterium sp.</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> (2) <i>Halomonas venusta/</i> <i>Halomonas alkaliphila</i> <i>Ochrobactrum sp.</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Proteus grp. Vulgaris</i> (4) <i>Proteus heimbachae</i> (2) <i>Proteus rettgeri</i> <i>Proteus sp.</i> (3) <i>Providencia sp. nov.</i> (2) <i>Providencia sp. nov.</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Pseudomonas grp fluorescens</i> <i>Pseudomonas grp putida</i> (3)
Phényléthylamine	134	2	5
Isomalyamine	828	627	38
Cadavérine	1327	1225	11
Histamine	945	84	22



Variants pathogènes

Fréquence d'association à des infections*	Genres ou espèces
	<p><i>Alcaligenes faecalis, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Morganella morganii, Pantoea agglomerans, Proteus rettgeri, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Stenotrophomonas maltophilia</i></p>
	<p><i>Acinetobacter johnsonii, Enterobacter hormaechei</i></p>
	<p><i>Chryseobacterium, Citrobacter braakii, Enterobacter amnigenus, Halomonas, Klebsiella terrigena, Kluyvera intermedia, Marinomonas, Providencia heimbachae, Pseudoalteromonas, Pseudomonas fragi, Pseudomonas lundensis, Psychrobacter, Raoultella planticola, autres Serratia, Stenotrophomonas rhizophila</i></p>

* non alimentaires



⇒ Résistance aux antibiotiques

⇒ Production d'amines

Survie dans milieux mimant conditions estomac et intestin

Sensibilité au sérum humain

Adhésion aux cellules Caco-2

Lethalité sur larves de *Galleria mellonella*

⇒ Sélection d'isolats représentatifs pour une **évaluation** des bénéfiques vs risques **en fromages**



☒ groupe «faible risque»:

Acinetobacter sp.,
Alcaligenes faecalis,
Hafnia alvei,
Halomonas sp.,
Pantoea agglomerans,
Proteus vulgaris,
Pseudomonas stutzeri,
Pseudomonas putida,
Psychrobacter celer

☒ groupe «risque élevé»:

Chryseobacterium sp.,
Citrobacter freundii,
Hafnia alvei,
Klebsiella oxytoca,
Halomonas venusta,
Morganella morganii,
Proteus vulgaris,
Providencia heimbachae,
Pseudomonas putida,
Stenotrophomonas maltophilia,
Sphingobacterium sp.

CONCLUSION



Grande diversité révélée

- ⇒ probablement sous estimée,
- ⇒ un potentiel d'activités aromatiques, antipathogènes, ... à explorer

Identification de risques

- ⇒ isolats appartenant à des espèces impliquées dans cas cliniques non alimentaires
- ⇒ véhicules d'antibiorésistances
- ⇒ capacité variable* à produire des amines biogènes *in vitro*