

Potentiel inhibiteur de la souche de *Brevibacterium linens* productrice de la linenscine OC2, vis-à-vis des listeria et de *Staphylococcus aureus*

HP Siswanto, JJ Gratadoux, J Richard*

Unité de recherches laitières, Inra, 78352 Jouy-en-Josas, France

(Reçu le 18 avril 1996 ; accepté le 27 août 1996)

Résumé – Vingt-quatre souches du genre listeria (14 de l'espèce *L. monocytogenes* et 10 de l'espèce *L. innocua*) et 24 souches de *Staphylococcus aureus* ont été testées pour leur sensibilité vis-à-vis du filtrat de culture de la souche de *Brevibacterium linens* OC2 dans un milieu de laboratoire. Toutes les souches ont été inhibées, celles de *S. aureus* étant un peu plus sensibles que celles de listeria. Ensuite, le potentiel inhibiteur de ce filtrat vis-à-vis de *L. monocytogenes* (une souche), de *L. innocua* (une souche) et de *S. aureus* (deux souches) a été testé à diverses concentrations. Selon la souche cible et la concentration du milieu de culture en filtrat, on a observé une chute de population ou seulement un effet bactériostatique, suivi, pour toutes les souches, d'une reprise de croissance. Le même phénomène de reprise de croissance a été observé dans le cas de culture en association de la souche inhibitrice avec un mélange de quatre souches de *L. monocytogenes*. On a montré par ailleurs que le filtrat cru ou chauffé 5 minutes à 100 °C restait stable pendant près d'un mois d'incubation à 30 °C. L'hypothèse d'une sous-population résistante dans les cultures en phase stationnaire des souches cibles a été vérifiée, et le niveau de cette sous-population a été déterminé à l'aide de la méthode de dénombrement microbien en milieu liquide et l'utilisation des nombres les plus probables (NPP).

***Brevibacterium linens* / *Listeria monocytogenes* / *Staphylococcus aureus* / linenscine / inhibition / résistance**

Summary – Inhibitory potential against *Listeria* spp and *Staphylococcus aureus* of the strain of *Brevibacterium linens* producing linenscin OC2. Twenty-four strains of the genus listeria (14 of *L. monocytogenes* and 10 of *L. innocua*) along with 24 strains of *Staphylococcus aureus* were tested for their sensitivity to the culture filtrate of *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium producing linenscin OC2, an inhibitory peptidic compound. All strains were inhibited, staphylococci being slightly more sensitive than listeria. The inhibitory potential of the filtrate towards *L. monocytogenes* and *L. innocua* (one strain of each), and two strains of *S. aureus* was investigated using three concentrations of the filtrate (0.1, 1 and 10%). A viability loss or a bacteriostatic effect was observed, depending on the strain and the amount of filtrate in the culture medium. The length of the phase of inhibition was correlated with filtrate concentration, after which all strains resumed growth at a rate decreasing as the percentage of filtrate increased. Regrowth of the survivors was also observed in mixed cultures of *B. linens* OC2 (10^7 cfu/mL in the inoculum) and a cocktail of four *L. mono-*

* Correspondance et tirés à part.

cytogenes strains (10^4 cfu/mL of each in the inoculum). As it has been shown that the inhibitory activity of the filtrate was stable over time, the presence of very low proportions of resistant cells in the sensitive population was investigated. Their level was predicted from the analysis of regrowth curves and confirmed using the Most Probable Numbers (MPN) technique of bacterial enumeration in liquid medium containing the filtrate in which five tubes were inoculated from each of three successive ten-fold dilutions. The proportion of listeria resistant to 10% of filtrate in the medium was in the range of 10^{-4} of the total population. Therefore, it can be predicted that if the contamination level of listeria is above 10^4 listeria on the surface of a piece of smear cheese at the time *B. linens* reaches a sufficient level to produce enough inhibitory substance, then linenscin-resistant survivors might survive and proliferate. Washing and brushing the surface of this kind of cheese during curing would contribute to the contamination of other cheeses and subsequently the entire factory environment by linenscin-resistant listeria. This would eventually abolish the possibility of controlling listeria and other undesirable bacteria on the surface of this kind of cheese by use of the strain of *B. linens* producing linenscin OC2. It is concluded that this strain must be used with care and only after full assessment of its efficacy on cheese surfaces in experiments carried out under strict containment conditions.

Brevibacterium linens / Listeria monocytogenes / Staphylococcus aureus / linenscin / inhibition / resistance

INTRODUCTION

La présence de *Listeria monocytogenes* dans les fromages constitue un risque potentiel de listériose pour certains consommateurs (Ryser et Marth, 1991). Ces auteurs ont par ailleurs mis en évidence la persistance de *L. monocytogenes* dans du fromage à croûte moisie, de type Camembert (Ryser et Marth, 1987) et à croûte lavée, de type Brick (Ryser et Marth, 1989) fabriqués avec du lait artificiellement contaminé en listeria. Ils ont confirmé l'observation de Terplan et al (1986) que la croissance de *L. monocytogenes* est plus importante à la surface que dans le cœur des fromages. De leur côté, Pini et Gilbert (1988) ont aussi observé que le niveau de *L. monocytogenes* était plus important à la surface qu'à l'intérieur des fromages.

Par ailleurs, un niveau élevé de bactéries de l'espèce *Staphylococcus aureus* dans les fromages présente également un risque, en raison d'une possible production de toxines (Genigeorgis, 1989 ; Mossel et Van Netten, 1990 ; Gilmour et Harvey, 1990). Il est bien connu que *S. aureus* est sensible à de faibles valeurs de pH, mais il pourrait se développer à la surface des fromages quand à la fois, le pH y est supérieur

à 7, et la température favorable à cette bactérie strictement mésophile. C'est une situation qui peut se présenter avec des fromages affinés dans le cas de rupture de la chaîne du froid, comme cela se produit souvent au dernier stade de leur commercialisation, ou chez les consommateurs. Il peut en résulter la production d'une quantité détectable d'entérotoxines quand le nombre de bactéries toxigènes dépasse largement 10^6 ufc/g (Tatini et al, 1971 et 1973 ; dos Santos et Genigeorgis, 1981 ; Ibrahim et al, 1981).

La question se posait donc de savoir si la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus* était susceptible d'être inhibée par certaines bactéries de la flore de surface des fromages à croûte lavée. Celle-ci est composée principalement de bactéries corynéformes, dont *B. linens*, et de micrococccacées, identifiables pour la plupart à *S. xylosus* (Richard et Gratadoux, 1984 ; Piton-Malleret et Gorrieri, 1992 ; Reys, 1993).

Les travaux qui sont présentés ici ont pour but de montrer le potentiel inhibiteur d'une souche de *B. linens*, ou du filtrat de culture de cette souche, vis-à-vis de listeria et de souches de *S. aureus* isolées de fromages. Cette souche de *B. linens* isolée de la surface d'un gruyère de Comté par

Ryser et al (1993) montrait, dans un système de laboratoire, une activité inhibitrice très marquée vis-à-vis des listeria. La linenscine OC2, la substance responsable de cette inhibition, est un peptide de 11 à 12 acides aminés, qui provoque éventuellement une lyse des cellules cibles (Maisnier-Patin et Richard, 1995).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Méthodes générales

Origine et conservation des souches

L'origine des souches utilisées dans cette étude est présentée dans le tableau I. La souche inhibitrice, *B. linens* OC2, et une souche de bactérie corynéforme orange non inhibitrice (OC9), ont été isolées de la morge d'un gruyère de Comté par Ryser et al (1993).

Toutes les souches étaient maintenues sur milieu gélosé TSA (Tryptose Soy Agar, Difco 370) supplémenté avec 0,6 % d'extrait de levure (Diagnostic Pasteur), ce qui donne le milieu TSAYE. Les souches étaient conservées à 4 °C et transférées chaque mois sur un milieu neuf.

Cultures bactériennes

Avant usage, une première culture était obtenue par transfert dans du bouillon TSBYE (Tryptose Soy Broth, Difco 369 additionné de 0,6 % d'extrait de levure) et incubation 24 à 48 heures à 30 °C, sauf les souches de *B. linens* qui, en raison de leur caractère aérobic strict, ont été cultivées avec agitation pendant 72 heures à 27 °C. Après cette première culture, les bactéries étaient arrivées en phase stationnaire de croissance. Juste avant leur utilisation, les cultures préparées précédemment étaient cultivées à nouveau dans du TSBYE incubé 24 heures à 30 °C pour les listeria et les staphylocoques, et 72 heures à 27 °C avec agitation, pour les bactéries corynéformes orange. La pureté de ces nouvelles cultures était vérifiée avant usage par examen microscopique et a posteriori, par l'homogénéité des colonies sur les milieux de dénombrement.

Dénombrements bactériens

D'une façon générale, le dénombrement des bactéries dans les cultures pures a été effectué par ensemencement à la surface de la gélose Tsaye, après une dilution appropriée des échantillons dans de l'eau peptonée à 0,1 %. Cet ensemencement était effectué à l'aide d'un ense-

Tableau I. Nature et origine des espèces bactériennes utilisées.
Nature and origin of the bacterial species used.

| Espèce | Code | Sérotype | Origine |
|--|--------------|----------|---------------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> ^(a) | V7 | 1 | lait cru |
| | SA | 4b | Scott A, isolat clinique |
| | CA | 4b | fromage, épidémie de Californie |
| | OH | 4b | fromage type Liederkranz, Ohio |
| | LM1 à LM6 | 1 | lait et fromage |
| | LM7 à LM10 | 4b | lait et fromage |
| <i>Listeria innocua</i> ^(b) | LIN3 à LIN12 | – | fromage |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ^(b) | SA2 à SA26 | – | fromage |
| <i>Brevibacterium linens</i> ^(c) | OC2 | | fromage de Comté |
| | OC9 | | fromage de Comté |
| | CNRZ 918 | | fromage de Comté |

^a Souches V7, SA, CA et OH : collection de ET Ryser, université du Wisconsin, États-Unis ; souches LM1 à LM10 : gracieusement fournies par le professeur Audurier, hôpital de la faculté de médecine de Tours. ^b Souches provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris. ^c Souches OC2 et OC9 : collection Arilait-Inra ; souche CNRZ 918 : collection de l'unité de recherches laitières, Inra de Jouy-en-Josas.

^a Strains V7, SA, CA et OH : collection of ET Ryser, University of Wisconsin, USA ; strains LM1 to LM10 : kindly provided by Pr Audurier, Hospital of the Medical School of Tours, France. ^b Strains from Pasteur Institute, Paris, France. ^c Strain OC2 and OC9 : collection of ARILAIT-INRA ; strain CNRZ 918 : collection of the Dairy Research Unit, INRA of Jouy-en-Josas.

menceur Spiral (Intersciences, France). Les colonies ont été comptées après 24 à 48 heures d'incubation à 30 °C pour les listeria et les staphylocoques, et après 5 jours à 30 °C pour *B. linens*.

Production de la linenscine OC2 par *B. linens* OC2, et mesure du potentiel inhibiteur du filtrat de culture

La souche inhibitrice OC2 a été ensemencée à 1 % dans le milieu TSBYE et incubée à 27 °C avec agitation. À intervalles réguliers, une fraction de la culture était centrifugée et le surnageant stérilisé par filtration (filtres Acrodisc, Gelman Sciences, Inc) de 0,45 µm de porosité. Le titre du filtrat a été déterminé par la méthode simplifiée des dilutions critiques (Mayr-Harting et al, 1972). Dans des boîtes de Petri (90 mm de diamètre) contenant 15 mL de milieu stérile Tsaye, on a coulé une couche superficielle de 4,5 mL de gélose nutritive molle (TSBYE + 0,75 % d'agar) additionnée de 0,5 mL d'une dilution à 1/100 de la souche cible (*L. monocytogenes*, souche V7) en phase stationnaire sur milieu TSBYE. Les boîtes ont été séchées à 30 °C pendant 2 heures, puis inoculées avec 10 µL de chacune de 12 dilutions successives à 1/2 du filtrat. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures. L'inverse de la plus forte dilution ne donnant plus d'inhibition est le nombre d'unités arbitraires (UA) contenues dans 10 µL. Le titre du filtrat est exprimé en unités arbitraires par millilitre (UA/mL).

Stabilité de l'activité inhibitrice de la linenscine dans le filtrat

La stabilité à 30 °C de l'activité inhibitrice de la linenscine OC2 dans un filtrat de culture de 72 heures a été déterminée comme indiqué précédemment directement (filtrat cru), et après chauffage du filtrat à 100 °C pendant 5 minutes, afin de dénaturer les enzymes extracellulaires qu'il contient. Le titre du filtrat cru et celui du filtrat chauffé ont été déterminés au temps zéro, puis après 1, 2, 3, 6, 13, 21 et 29 jours d'incubation à 30 °C. De même, on a vérifié avant chaque usage le titre du filtrat cru conservé à -20 °C.

Sensibilité des souches de *Listeria sp* et de *S. aureus vis-à-vis du filtrat de culture de la souche *B. linens* OC2*

La sensibilité de 24 souches de *Listeria* (14 de l'espèce *L. monocytogenes* et 10 de l'espèce *L. innocua*) et de 24 souches de *S. aureus vis-à-vis du filtrat de B. linens* OC2 a été déterminée semi-quantitativement. Pour cela, on a utilisé la même méthode des dilutions critiques que dans l'étude précédente, en prenant chacune de ces souches comme souche cible. Le même filtrat après 30 jours environ de stockage à -20 °C était utilisé pour cette étude.

Croissance de *L. monocytogenes* en présence de *B. linens* (la souche inhibitrice OC2 et une souche témoin)

Cette expérience a été réalisée afin de voir si *L. monocytogenes* était en mesure de se développer durant la production d'un levain de bactéries de surface. Les cultures en association consistaient en un mélange initial de 10⁷ ufc/mL de *B. linens* (la souche inhibitrice OC2 ou la souche témoin OC9 non inhibitrice) et de 10⁴ ufc/mL d'un cocktail à parts égales de quatre souches de *L. monocytogenes* (SA, CA, OH et V7) dans du TSBYE, toutes ces bactéries étant préalablement en phase stationnaire. Les cultures ont été conduites à 27 °C avec agitation jusqu'à la phase stationnaire de *B. linens* (soit environ 96 h). Des cultures séparées de *B. linens* et du mélange de *L. monocytogenes* étaient également réalisées dans des conditions identiques aux cultures en association. Les prélèvements ont été effectués toutes les 2 heures, afin de déterminer le nombre de chacune des bactéries dans les cultures.

Deux méthodes de dénombrement de *L. monocytogenes* en présence de la souche de *B. linens* productrice de linenscine ont été expérimentées séparément et en combinaison : (a) centrifugation de la culture pour éliminer la substance inhibitrice et reprise du culot de centrifugation dans de l'eau peptonée, et (b) utilisation, pour le dénombrement de *L. monocytogenes*, de conditions empêchant le développement de *B. linens*. Une étude préliminaire a montré que l'ensemencement sur le milieu non sélectif Tsaye, mais avec incubation des boîtes de Petri pendant 48 heures à 37 °C en aérobiose suffisait à

satisfaire cette dernière condition. Le niveau de *B. linens* était estimé après incubation à 30 °C d'une autre boîte de Petri contenant le milieu Tsaye. Les listeria étant dans tous les cas très largement sous-dominantes, les résultats de dénombrements de *B. linens* n'étaient pas affectés par la présence de quelques colonies de listeria.

Inhibition de la croissance des listeria et de *S. aureus* en présence de filtrat de la culture de *B. linens*, souche OC2

Des cultures de deux souches de listeria (*L. monocytogenes* V7 et *L. innocua* LIN11) et de quatre souches de *S. aureus* (souches SA2, SA5, SA8 et SA21) contenant environ 10^6 ufc/mL en phase stationnaire ont été réalisées à 30 °C dans du TSBYE en présence de 0,1 %, 1 % et 10 % de filtrat de la souche OC2 utilisé précédemment. La croissance des souches cibles a été suivie par dénombrement à la surface du milieu Tsaye. On a également déterminé le titre de quelques cultures au cours de cette incubation, à l'aide de la méthode exposée précédemment.

Mise en évidence de sous-populations résistantes, et estimation de leur niveau

Puisque le titre des cultures réalisées au point précédent ne variait pas, l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la reprise de croissance après une phase d'inhibition des souches cibles en présence de la souche OC2, ou d'un filtrat de cette culture, était la présence de cellules résistantes à la linenscine OC2 au sein de ces populations bactériennes. Pour vérifier cette hypothèse, une culture en phase stationnaire (population d'environ $2 \cdot 10^9$ ufc/mL) de la souche *L. innocua* LIN11 et de la souche *S. aureus* SA5 dans du TSBYE à 30 °C, a été diluée à 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} dans 100 mL de TSBYE contenant du filtrat de culture de la souche OC2 (10 % pour *L. innocua* Lin11, et seulement de 1 % pour *S. aureus* SA5). Ces trois dilutions, dans lesquelles on a donc ajouté environ 2000, 200 et 20 ufc/mL ont été ensuite réparties en deux séries de cinq tubes de 10 mL. Les tubes ont été incubés à 30 °C pendant une semaine. Le niveau de cellules

résistantes dans la première dilution (à 10^{-6}) a ensuite été estimé par la méthode des nombres les plus probables (NPP), en disposant pour cela de deux séries de cinq tubes couvrant trois dilutions successives. Le nombre de bactéries résistantes dans la culture mère a été déterminé en multipliant les résultats par 10^6 .

RÉSULTATS

Production de la linenscine OC2 par *B. linens* OC2 et mesure du potentiel inhibiteur du filtrat de culture

La production de linenscine OC2 atteint un maximum quand la culture de la souche productrice arrive en phase stationnaire de croissance (entre 60 et 80 heures d'incubation à 27 °C), puis l'activité du filtrat di-

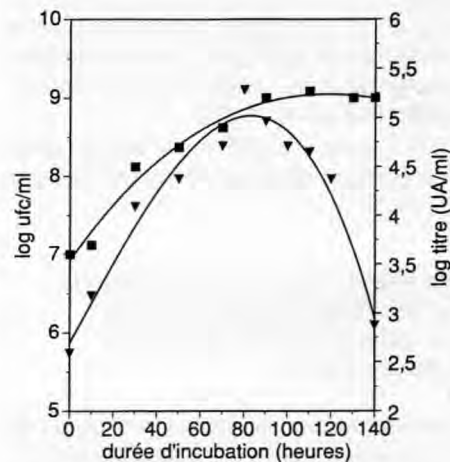


Fig 1. Croissance de *Brevibacterium linens*, souche OC2 en culture agitée à 27 °C dans le milieu TSBYE, et activité inhibitrice du surnageant filtré (titre par rapport à la souche *Listeria innocua* LIN11). ▼ : log du titre en unités arbitraires (UA/mL) ; ■ : log de la concentration cellulaire (ufc/mL).

Growth of Brevibacterium linens, strain OC2, at 27 °C in aerated TSBYE medium and inhibitory activity of the filtered supernatant, using Listeria innocua strain LIN11 as test organism. ▼ : log of titre in arbitrary units (AU/mL); ■ : cell concentration (log CFU/mL).

minue de façon très marquée (fig 1). Le maximum d'activité (5,3 unités de log, soit $2,0 \cdot 10^5$ UA/mL) a été obtenu à 80 heures. Après 140 heures d'incubation à 27 °C, le log du titre est descendu à 2,8 (630 UA/mL).

Stabilité de l'activité inhibitrice du filtrat

L'hypothèse selon laquelle les protéases présentes dans la culture dénaturent cette substance peut être rejetée. En effet, il n'y a pas de diminution significative de l'activité du filtrat cru pendant près d'un mois d'incubation à 30 °C (résultats non présentés). La diminution du titre en présence des cellules productrices pourrait être due à l'adsorption de la linenscine sur la paroi des cellules productrices (Dajani et Wannamaker, 1973). Cependant, aucune activité n'a été retrouvée après traitement des cellules à chaud en milieu acide (Tramer et Fowler, 1964 ; Yang et al, 1992).

On a aussi observé que le titre du filtrat n'avait pas varié durant 4 mois de stockage à -20 °C.

Sensibilité des souches de listeria et de staphylocoques vis-à-vis du filtrat de culture de B linens (souche OC2)

Les 24 souches de listeria (14 souches de *L monocytogenes* et 10 souches de *L innocua*) présentent des sensibilités tout à fait comparables vis-à-vis du filtrat (fig 2A). On notera que la souche V7 de *L monocytogenes* ayant servi à déterminer le titre du filtrat est bien représentative de l'espèce. Cette sensibilité uniforme des listeria à la linenscine OC2 démarque donc nos résultats de ceux de Sulzer et Busse (1991), qui ont indiqué que les bactéricines (ou autres substances inhibitrices) produites par les souches de *B linens* qu'ils ont isolées n'agissaient pas de la

même façon sur toutes les souches de listeria.

Dans l'ensemble, les souches de *S aureus* sont un peu plus sensibles que celles de listeria vis-à-vis de la substance produite par notre souche de *B linens*, puisque le titre du filtrat est en moyenne, avec *S aureus*, le double de celui observé avec listeria (écart moyen de 0,3 unité de log, fig 2B).

En revanche, les variations entre souches sont plus importantes que dans le cas des listeria. Par exemple, la souche SA18 est la plus résistante et la souche SA2 la plus sensible, puisqu'avec la première, le filtrat titrerait seulement 6 400 UA/mL (soit 3,8 unités de log), et 204 800 UA/mL (soit 5,3 unités de log) avec cette dernière.

Croissance de L monocytogenes en présence de la souche inhibitrice de B linens OC2 ou de la souche témoin non inhibitrice OC9

Le dénombrement de *L monocytogenes* en présence d'une souche de *B linens* productrice d'une substance inhibitrice pouvait poser un problème. En effet, l'inhibition était susceptible de se produire, ou de se poursuivre, à la surface du milieu de dénombrement des listeria, du fait du transfert, sur ce milieu de la substance inhibitrice présente dans le milieu de culture. Les deux mesures prises pour éviter ce risque (centrifugation et lavage des cellules et numération des listeria dans des conditions retardant la croissance de *B linens*) ont donné, séparément et en combinaison, des résultats tout à fait comparables. Par conséquent, nous avons abandonné la centrifugation et le lavage des cellules.

Avec la souche témoin non inhibitrice OC9, le mélange de listeria croît de la même façon que si ces bactéries étaient seules en culture (fig 3A). En revanche, en présence de la souche de *B linens* OC2, on observe une inhibition marquée du mélange des quatre souches de *L monocy-*

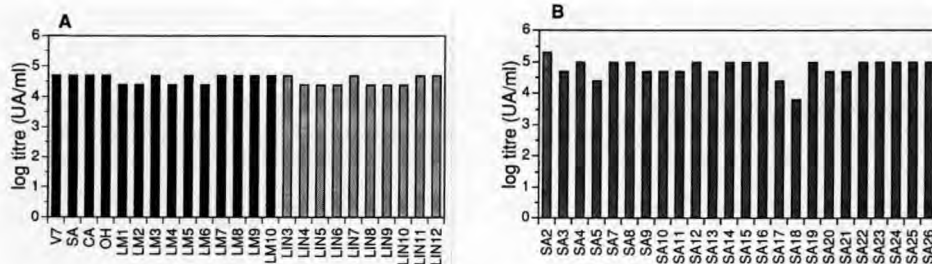


Fig 2. Activité inhibitrice du filtrat de culture de *Brevibacterium linens*, souche OC2 dans le milieu TSBYE, vis-à-vis (A) de *Listeria monocytogenes* (barres noires) et de *Listeria innocua* (barres grises) (B) de *Staphylococcus aureus* (titre par rapport à chacune des souches utilisées).
Inhibitory activity of the filtrate of Brevibacterium linens, strain OC2 culture at 27 °C in aerated TSBYE medium towards (A) Listeria monocytogenes (black bars) and Listeria innocua (grey bars) and (B) Staphylococcus aureus (titre of the filtrate, using each strain as test organism).

togenes (fig 3B). Néanmoins, après 96 heures d'incubation, les listeria atteignaient une population d'environ 10^9 ufc/mL. Leur croissance peut être attribuée à la perte d'activité du filtrat en présence de la souche productrice, comme cela a été observé précédemment (fig 1), à une dégradation de la linenscine par des enzymes produites par les listeria ou au développement de cellules résitantes présentes dans ces populations de listeria.

Inhibition de la croissance des listeria et de S aureus en présence du filtrat de la culture de B linens OC2

Le comportement de *L. monocytogenes*, souche V7, en fonction de la concentration du milieu en filtrat de culture de la souche de *B. linens* OC2 est illustré par la figure 4. En présence de 10 % de filtrat, on observe une chute de population d'environ 1,8 unité de log vers la 7^e heure, suivie d'une augmentation, en 2 heures, d'une unité de log, après quoi la population reste stable jusqu'à 48 heures. En présence de 1 et 0,1 % de filtrat, on observe seulement un effet bactériostatique, dont la durée est fonction de la concentration du milieu en filtrat. Par la suite, la listeria reprenait sa croissance, mais à un taux plus faible en présence de

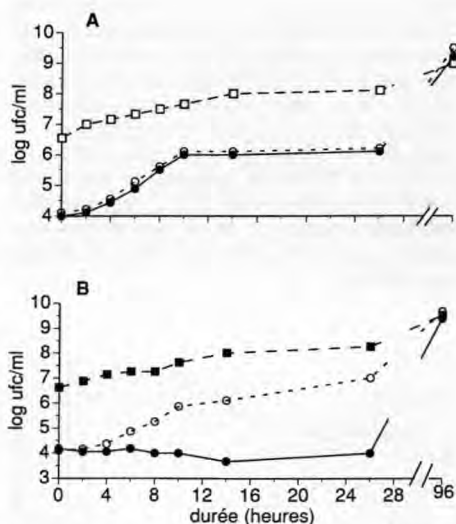


Fig 3. Croissance à 27 °C dans le milieu TSBYE sans agitation de *Listeria monocytogenes* (mélange à parts égales de quatre souches) en présence (A) de *Brevibacterium linens*, souche OC9 non inhibitrice (□) et (B) de *B. linens*, souche inhibitrice OC2 (■). (● et ○ : listeria respectivement en présence et en l'absence de *B. linens*).

Growth at 27 °C in TSBYE without agitation of Listeria monocytogenes (balanced mixture of four strains) in presence of (A) a non-inhibitory strain of Brevibacterium linens (□) and (B) the inhibitory strain B. linens OC2 (■). (● and ○ : listeria in presence and absence of B. linens, respectively).

1 % qu'en présence de 0,1 % de filtrat. Le niveau final de ces cultures en présence de filtrat était cependant le même que celui de la culture témoin sans filtrat.

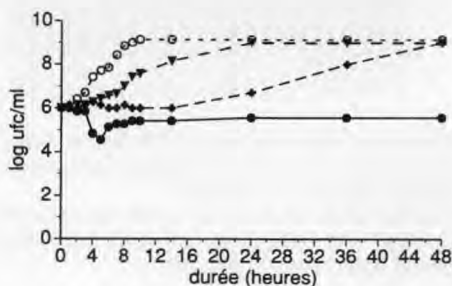


Fig 4. Comportement à 30 °C dans le milieu TSBYE de *Listeria monocytogenes* souche V7 en présence de filtrat de culture de *Brevibacterium linens*, souche OC2 dans le même milieu (○, ▼, ◆, et ● : respectivement absence, présence de 0,1 %, 1 % et 10 % de filtrat).
Behaviour of *Listeria monocytogenes* strain V7 at 30 °C in TSBYE in presence of the filtered culture of *Brevibacterium linens*, strain OC2 in the same medium (○, ▼, ◆, and ●: absence, presence of 0.1%, 1% and 10% of filtrate, respectively).

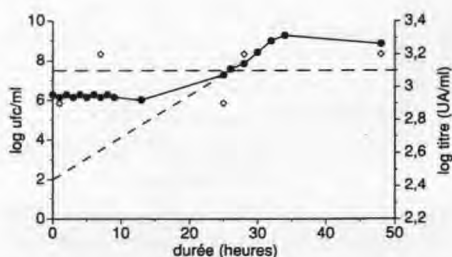


Fig 5. Comportement de *Listeria innocua*, souche LIN11, à 30 °C dans le milieu TSBYE en présence de 10 % de filtrat de la culture de *Brevibacterium linens*, souche OC2 dans le même milieu (les losanges creux indiquent l'activité inhibitrice du milieu en UA/mL).
Behaviour of *Listeria innocua* strain LIN11 at 30 °C in TSBYE in presence of 10% of the filtered culture of *Brevibacterium linens*, strain OC2 in the same medium (open lozenge symbols indicate the inhibitory activity of the medium in AU/mL).

Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus avec *L. innocua* LIN11 (fig 5). On a montré également, dans cette expérience, que le titre du milieu ne changeait pas en cours d'incubation. On remarquera, en outre, que l'extrapolation au temps zéro de la phase de croissance suggère un niveau initial de cellules résistantes de l'ordre de 10^2 /mL, soit une proportion de l'ordre de 10^{-4} de la population totale en début de culture.

Les quatre souches de *S. aureus* ont montré le même comportement général en présence de filtrat. Pour la souche SA5 (fig 6), on a observé une chute de population de une unité de log en 6 heures, en présence de 1 % et 0,1 % de filtrat, et de trois unités de log en 15 heures, en présence de 10 %, après quoi cette souche reprenait sa croissance pour atteindre environ 2×10^9 ufc/mL en phase stationnaire. Comme dans le cas des listeria, on notera un taux de croissance des bactéries survivantes inférieur à celui de la culture témoin. De même, l'extrapolation à $t = 0$ de la phase de croissance de cette souche en présence de 1 % de filtrat suggère l'existence d'une population résistante dans une proportion également de l'ordre de 10^{-4} de la population totale en début de culture. Avec la souche SA2, la plus sensible, on n'a pas détecté de reprise de croissance en présence de 1 et 10 % de filtrat jusqu'à 144 heures de culture. En présence de 0,1 % de filtrat, on avait une chute de population d'environ deux unités de log vers la 10^e heure, et une reprise de la croissance jusqu'à la phase stationnaire, atteinte vers la 33^e heure. On a vérifié avec deux souches (SA8 et SA21) que le titre de la suspension bactérienne ne variait pas durant toute la période d'incubation.

Un phénomène semblable (chute de population suivie d'une reprise de croissance) a été observé avec une souche de *S. xylosum* et une souche d'*Enterococcus faecalis*, toutes deux isolées de la surface de fromages du commerce en

raison de leur activité inhibitrice vis-à-vis des listeria (Ryser et al, 1993).

Mise en évidence de sous-populations de listeria et de staphylocoques résistantes, et estimation de leur niveau

On a d'abord vérifié que les souches ayant repris leur croissance après une phase d'inhibition en présence de filtrat sont résistantes à la linenscine contenue dans le filtrat de culture de la souche *B. linens* OC2. En effet, elles se développaient en présence de filtrat neuf, de la même façon que dans le même milieu sans filtrat, alors qu'une inhibition de plus de 10 heures était observée avec la culture d'origine.

Par extrapolation, comme indiqué sur les figures 5 et 6, nous avons estimé que la proportion de cellules résistantes dans la population totale de listeria ou de staphylocoques pouvait être de l'ordre de 10^{-4} , si

l'on exclut une phase de latence des cellules résistantes. Nous avons donc dilué une culture en phase stationnaire de chacune de ces deux souches dans le milieu TSBYE contenant une concentration appropriée de filtrat, de façon à avoir présence ou absence d'une bactérie résistante dans 10 mL de cette suspension, et à pouvoir utiliser la méthode de numération fondée sur les nombres les plus probables.

Le tableau II donne le détail de la procédure pour l'exemple illustré sur la figure 5. La dilution 10^{-6} de la suspension bactérienne donne une concentration cellulaire de $2 \cdot 10^3$ par mL. Chaque tube de 10 mL de milieu contient donc au total $2 \cdot 10^4$ bactéries, dont statistiquement deux sont supposées être résistantes. Tous les tubes devraient donc permettre une culture après incubation prolongée en présence de filtrat. Pour la dilution suivante, seulement un ou deux tubes sur dix devraient donner une culture, et dix fois moins encore à la dilution

Tableau II. Estimation du niveau de bactéries résistantes à l'addition de 10 % de filtrat (environ 1000 UA/mL de linenscine OC2) dans la population de *Listeria innocua* LIN11, par la méthode de dénombrement en milieu liquide (méthode des nombres les plus probables avec deux séries de cinq tubes et trois dilutions).

Determination of the level of bacteria resistant to 10 % of filtrate of the culture of Brevibacterium linens OC2 (ca 1,000 AU/mL of linenscin OC2) in the population of Listeria innocua LIN11, using the method of bacterial enumeration in liquid media and the most probable numbers on two series of five tubes per dilution.

| Log de la dilution | Population prédite par tube ^(a) | | Nombre de tubes positifs ^(b) | |
|--------------------|--|-------------------|---|---------|
| | Totale | Résistante | Série 1 | Série 2 |
| - 6 | $2 \cdot 10^4$ | $2 \cdot 10^0$ | 4/5 | 5/5 |
| - 7 | $2 \cdot 10^3$ | $2 \cdot 10^{-1}$ | 2/5 | 2/5 |
| - 8 | $2 \cdot 10^2$ | $2 \cdot 10^{-2}$ | 0/5 | 0/5 |

^a Sur la base de $2 \cdot 10^9$ ufc/mL de la culture mère en phase stationnaire. ^b Résultat des dénombrements par la méthode des nombres les plus probables (NPP) après 7 jours d'incubation à 30 °C : nombre caractéristique : série 1 : 420 ; série 2 : 520 ; NPP respectivement 22 et 49 (moyenne 36) cellules résistantes dans 100 mL de la dilution à 10^{-6} , soit $3,6 \cdot 10^5$ par mL de la solution mère.

^a On the basis of $2 \cdot 10^9$ cfu/mL of the original culture in stationary phase of growth. ^b Results of the enumeration by the most probable numbers: characteristic numbers: series 1 and 2: 420 and 520, respectively corresponding to concentrations of 22 and 49 (average 36) resistant cells in 100 mL of dilution at 10^{-6} . As a result, the culture contained $3.6 \cdot 10^5$ resistant cells per mL.

suivante. On a vérifié que la culture intervenait en moins de 3 jours dans tous les tubes de la dilution 10^{-8} (20 cellules par tube) sans filtrat.

La méthode des NPP montre que la concentration de cellules résistantes à 10 % de filtrat dans la population totale était de $3,6 \cdot 10^5$ cellules (moyenne de deux séries de tubes), soit bien une proportion voisine de 10^{-4} . Un calcul similaire avec *S aureus*, souche SA5, donne $4,8 \cdot 10^5$ cellules résistantes dans une culture en phase stationnaire (soit environ $2 \cdot 10^9$ cellules par mL), ce qui est bien conforme à la prédiction illustrée sur la figure 6.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'activité inhibitrice de souches de l'espèce *B linens* vis-à-vis de diverses bactéries a déjà été étudiée par plusieurs auteurs. La souche sur laquelle ont travaillé Grecz et al (1961 et 1962) avait la capacité d'inhiber *C botulinum*, *S aureus* et *B cereus*, mais l'agent causal n'a pas été identifié.

Plus récemment, Valdes-Stauber et al (1991) ont étudié l'effet inhibiteur sur *L monocytogenes* d'un filtrat de culture de plusieurs souches de *B linens*. Ils ont constaté, selon les souches de cette espèce, qu'un pourcentage variable de souches de *L monocytogenes*, de *L innocua* et de *L ivanovii* étaient inhibées. La souche de *B linens* que nous avons isolée paraît plus active vis-à-vis des listeria, puisque toutes les souches testées ont été inhibées à peu près avec la même concentration en filtrat.

La linenscine OC2, la substance inhibitrice produite par la souche de *B linens* OC2, a été caractérisée par Maisnier-Patin et Richard (1995). Il s'agit d'une molécule d'un poids moléculaire de 1200 Da environ, composée de huit acides aminés différents, dont la moitié sont des résidus proline, sur les 11 à 12 résidus que comporte la molécule. Le mode d'action de cette substance a été également déterminé. La formation de protoplastes précédant la lyse

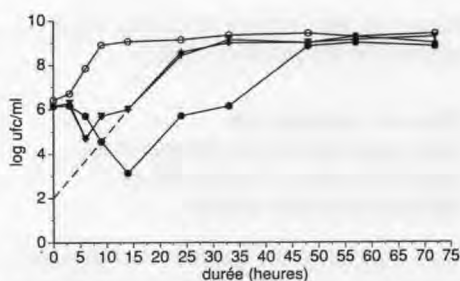


Fig 6. Comportement de *Staphylococcus aureus*, souche SA5, à 30 °C dans le milieu TSBYE en présence de filtrat de la culture *Brevibacterium linens*, souche OC2 dans le même milieu (○, ▼, ◆, et ● : respectivement absence, 0,1 %, 1 % et 10 % de filtrat).
Behaviour of *Staphylococcus aureus* strain SA5 at 30 °C in TSBYE in presence of the filtered culture of *Brevibacterium linens*, strain OC2 in the same medium (○, ▼, ◆, and ● : respectively absence, 0.1%, 1% and 10% of filtrate, respectively).

des souches cibles indique une activité au niveau de la paroi de celles-ci. On n'a pas mis en évidence d'efflux de matériel intracellulaire, en particulier d'ATP, sauf à des concentrations aboutissant à une lyse cellulaire. C'est donc un mécanisme d'inhibition apparemment différent de celui des bactériocines de bactéries à Gram positif.

À défaut de plus d'information sur la nature, ou les propriétés des substances inhibitrices produites par les souches isolées par Valdes-Stauber et al, il est difficile de dire, pour l'instant, si notre souche de *B linens* produit la même substance inhibitrice que celles-ci, mais en plus grande quantité, ou si elle produit une autre substance.

Le fait que dans la population d'une souche cible, une proportion importante (de l'ordre de 10^{-4}) de cellules soit résistante, peut être considéré comme un inconvénient du point de vue de l'activité inhibitrice de la souche de *B linens* productrice de la linenscine OC2. En effet, il faudrait que la population de la souche

cible, à la surface d'un fromage, soit largement inférieure à 10^4 cellules au moment où la linenscine est produite, de façon à éviter l'apparition de cellules résistantes. Cette situation peut en effet se produire, si l'on tient compte du fait que les listeria poussent à la surface des fromages bien plus rapidement que *B. linens*. Les listeria peuvent donc dépasser ce seuil de 10^4 cellules, bien avant que la linenscine soit produite.

Dans ce cas, on pourrait assister, en cours d'affinage des fromages, à la prolifération des cellules résistantes. Les soins pratiqués en cave d'affinage des fromages à croûte lavée (lavage et frottage de la surface) sont de nature à favoriser la dispersion des bactéries résistantes d'un fromage à l'autre, puis dans tout l'atelier et finalement dans l'environnement. Si cette éventualité se produisait, il deviendrait désormais impossible d'inhiber les listeria à la surface de ce type de fromages par l'utilisation de la souche de *B. linens* productrice de la linenscine OC2. On peut alors espérer que la résistance à la linenscine OC2 ne s'accompagnerait pas d'une résistance à d'autres substances de ce type, comme c'est le cas de la résistance à la nisine (Song et Richard, 1996).

La contrepartie favorable d'une fréquence élevée de cellules résistantes dans une population bactérienne est qu'il devrait être facile d'isoler des souches de bactéries constituant la flore d'affinage (micrococécées et autres ; Richard et Zadi, 1983 ; Piton-Malleret et Gorrieri, 1992) résistantes à l'action de la linenscine OC2. Leur croissance à la surface des fromages à croûte lavée ne serait donc pas inhibée par la souche de *B. linens* OC2.

Le mécanisme de résistance des listeria et des staphylocoques vis-à-vis de la linenscine OC2 n'est pas encore élucidé. On peut cependant déjà exclure une dégradation de la linenscine OC2 par les souches cibles. Deux arguments sont en faveur de cette thèse. D'abord, on a montré que les bactéries qui survivaient à l'action

de la linenscine OC2 et se développaient dans le milieu de culture auquel on avait ajouté le filtrat de culture de la souche productrice étaient résistantes à cette substance. Si la linenscine OC2 avait été dégradée par des enzymes produites par les cellules cibles, ces dernières seraient restées sensibles à cette substance, et auraient donc été inhibées en présence de filtrat neuf. On a également observé au cours des expériences réalisées avec *L. innocua* (fig 5) et de deux souches de *S. aureus* (SA8 et SA21, résultats non présentés) que l'activité inhibitrice du filtrat de culture de *B. linens* OC2 ne variait pas en fonction du temps.

En conclusion, la souche *B. linens* OC2 possède un potentiel inhibiteur intéressant vis-à-vis de bactéries indésirables pouvant se développer à la surface des fromages à croûte lavée. Ce potentiel doit évidemment être vérifié dans les conditions réelles, c'est-à-dire à la surface de fromages à croûte lavée. De nombreux problèmes méthodologiques doivent d'abord être résolus. C'est une phase de travail en cours dans notre unité de recherche. La présente étude montre que pour que le système inhibiteur fonctionne durablement, le niveau des bactéries à inhiber doit être le plus bas possible. Son utilisation ne doit donc pas être envisagée comme une alternative à une hygiène rigoureuse au niveau de la qualité du lait mis en œuvre et de la fabrication des fromages, mais comme un complément. Sinon, on risquerait d'assister à l'augmentation de la fréquence de cellules résistantes à la linenscine OC2 dans les ateliers de production de ce type de fromages, et à leur dissémination dans l'environnement.

REMERCIEMENTS

HP Siswanto était bénéficiaire d'une bourse de thèse du gouvernement français et les travaux ont été réalisés avec une participation financière du CNIEL (Centre national d'industrie et d'économie laitière).

RÉFÉRENCES

- Dajani SA, Wannamaker LW (1973) Kinetic studies on the interaction of bacteriophage type 71 staphylococcal bacteriocin with susceptible bacteria. *J Bacteriol* 114, 738-742
- dos Santos EC, Genigeorgis CA (1981) Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. *J Food Prot* 44, 177-184
- Genigeorgis CA (1989) Present state of knowledge of staphylococcal intoxication. *Int J Food Microbiol* 9, 327-360
- Gilmour A, Harvey J (1990) Staphylococci in milk and milk products. In: *Staphylococci* (D Jones, RG Board, M Sussman, eds). *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 69, Blackwell Scientific Publication, Oxford
- Grech N, Dack GM, Hedrick LR (1961) Antimicrobial agent of aged surface ripened cheese. I. Isolation and assay. *J Food Sci* 26, 72-78
- Grech N, Dack GM, Hedrick LR (1962) Antimicrobial agent of aged surface ripened cheese. II. Source and properties of the active principle (s). *J Food Sci* 27, 335-387
- Ibrahim GF, Radford DR, Baldock AK, Ireland LB (1981) Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A production in Cheddar cheese produced with induced starter failure. *J Food Prot* 44, 189-193
- Maisnier-Patin S, Richard J (1995) Activity and purification of linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Appl Environ Microbiol* 61, 1847-1852
- Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW (1972) Methods for studying bacteriocins. In: *Methods in microbiology*, vol 7A (JR Norris, DW Ribbons, eds). Academic Press, London
- Mossel DAA, Van Netten P (1990) *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. In: *J Appl Bacteriol Symp Suppl* 69, Blackwell Scientific Publication, Oxford
- Pini PN, Gilbert RJ (1988) The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int J Food Microbiol* 6, 317-320
- Piton-Malleret C, Gorrieri M (1992) Nature et variabilité de la flore microbienne dans la morge des fromages de Comté et de Beaufort. *Lait* 72, 143-164
- Reps A (1993) Bacterial surface-ripened cheeses. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol 2 (PF Fox, ed). Chapman & Hall, London, 137-172
- Richard J, Zadi H (1983) Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait* 63, 25-42
- Richard J, Grataudoux JJ (1984) Évolution de la flore microbienne à la surface des camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait* 64, 496-520
- Ryser ET, Marth EH (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *J Food Prot* 50, 372-378
- Ryser ET, Marth EH (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Brick cheese. *J Dairy Sci* 72, 838-853
- Ryser ET, Marth EH (1991) *Listeria*, *Listeriosis*, and *Food Safety*. Marcel Dekker, Inc, New York
- Ryser ET, Maisnier-Patin S, Grataudoux JJ, Richard J (1993) Incidence and nature of bacteria on smear-ripened cheeses inhibitory to *Listeria* spp. *Int J Food Microbiol* 21, 237-246
- Song HJ, Richard J (1996) Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub-minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *FEMS Microbiol Lett* (soumis)
- Sulzer G, Busse M (1991) Die Entwicklung von Listerien auf Camembert und deren Beeinflussung durch Keime mit einer Hemmwirkung auf Listerien. *DMZ-Lebensm Ind Milchwirtsch* 112, 80-84
- Tatini SR, Jezeski JJ, Morris HA, Olson Jr JC, Casman EP (1971) Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. *J Dairy Sci* 54, 815-825
- Tatini SR, Wesala WD, Jezeski JJ, Morris HA (1973) Production of staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella and Swiss cheeses. *J Dairy Sci* 56, 429-435
- Terplan G, Schoen R, Springmeyer W, Degle I, Becker H (1986) *Listeria monocytogenes* in Milch und Milchprodukten. *Dtsch Molk Ztg* 4, 1358-1368
- Tramer J, Fowler GG (1964) Estimation of nisin in foods. *J Sci Food Agric* 15, 522-528
- Valdes-Stauber N, Götz H, Busse M (1991) Antagonistic effect of coryneform bacteria from red-smear cheese against *Listeria* species. *Int J Food Microbiol* 13, 119-130
- Yang R, Johnson MC, Ray B (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58, 3355-3359