

Etude des effets barrière de communautés microbiennes modèles à activité anti-*Listeria* en microcosme fromager

IMRAN M. (1), VERNOUX J.-P. (1), LEDAUPHIN J. (2), BERNAY B. (3), DESMASURES N. (1)

(1) Unité de Recherche Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (UR ABTE) EA 4651, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen cedex, France

(2) Unité de Recherche Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (UR ABTE) EA 4651, Université de Caen Basse-Normandie, Bd du Maréchal Juin, 14032 Caen cedex, France

(3) Plateforme Proteogen, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen cedex, France

RESUME

Nous avons cherché à comprendre comment des micro-organismes interagissent dans un écosystème fromager pour exprimer une activité anti-*Listeria*. Les objectifs étaient (1) de déterminer si la complexité des communautés microbiennes est nécessaire à l'expression de l'activité, (2) d'étudier le rôle des souches dans cette fonctionnalité et (3) d'identifier des marqueurs moléculaires de la fonctionnalité inhibitrice. Partant d'un consortium fromager inhibiteur, 89 isolats microbiens ont été utilisés pour construire des communautés microbiennes de complexité variable, dont les potentialités inhibitrices envers *Listeria monocytogenes* WSLC 1685 ont été déterminées. L'effet inhibiteur était dû à des équilibres favorables et non à la complexité. Pour deux communautés, la croissance des souches a été suivie. L'omission une à une de chaque souche affectait peu l'activité anti-*Listeria*. Les profils métaboliques (analysés par GC-MS) et métagénomiques (électrophorèse 2D-MALDI TOF/TOF) d'une communauté modèle ont été déterminés en présence/absence de *L. monocytogenes*. L'expression, par la communauté, de protéines de stress et de diverses enzymes augmentait de manière significative en présence de *L. monocytogenes*. Une augmentation de la production de certains métabolites (notamment alcools et acide acétique) était associée, pouvant contribuer à un effet inhibiteur multi-barrières.

Study of hurdle effect of model microbial communities exhibiting antilisterial activity in a cheese microcosm

IMRAN M. (1), VERNOUX J.-P. (1), LEDAUPHIN J. (2), BERNAY B. (3), DESMASURES N. (1)

(1) Unité de Recherche Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (UR ABTE) EA 4651, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen cedex, France

SUMMARY

We investigated how microorganisms interact in a cheese microcosm enabling them to express antilisterial activity. The objectives were (1) to determine whether the complexity of microbial communities is required or not for antilisterial activity, (2) to study the role of individual strains in antilisterial activity and (3) to identify molecular markers signing this activity. To do this, starting with an inhibitory cheese consortium, 89 microbial isolates were used to build microbial communities with variable levels of complexity. Their antilisterial activity was recorded towards *Listeria monocytogenes* WSLC 1685. The inhibitory effect was shown to be due to a favorable microbial balance but not to high complexity. Two communities were selected. Microbial dynamics were monitored. The omission of each strain in turn did not significantly decrease antilisterial activity of the reduced communities obtained. The metabolic profile (analyzed using GC-MS) and metaproteomic profile (2D-gel electrophoresis coupled to MALDI TOF/TOF) of one selected community was determined in the presence and absence of *L. monocytogenes*. The community expressed significantly higher amounts of stress proteins, and various enzymes in the presence of *L. monocytogenes*. A higher production of some metabolites (notably alcohols and acetic acid) was recorded, possibly contributing to the multiple hurdle effect.

INTRODUCTION

Dans l'environnement laitier, à tous les stades, depuis l'environnement de l'animal (Verdier-Metz *et al.*, 2012 ; Vacheyrou *et al.*, 2011) en passant par le lait (Callon *et al.*, 2007 ; Mallet *et al.*, 2012) et jusqu'au produit fini, des micro-organismes sont présents. Par le biais de leur diversité, différentes fonctions peuvent s'exprimer, qui interviennent dans les futures caractéristiques organoleptiques et sanitaires des produits, et notamment des fromages. Concernant les aspects sanitaires, la biodiversité microbienne peut être à l'origine du contrôle de la croissance des micro-organismes potentiellement pathogènes en jouant le rôle de barrière biologique (Eppert *et al.*, 1997). Les mécanismes mis en jeu dans ce cas sont encore mal compris. Dans le cadre de ce travail, nous avons cherché à déterminer comment des micro-organismes peuvent interagir dans un écosystème fromager pour exprimer une activité anti-*Listeria*. Les objectifs de ce

travail étaient (1) de déterminer si la complexité des communautés microbiennes est nécessaire à l'expression d'une activité anti-*Listeria*, (2) d'évaluer le rôle individuel des souches dans la fonctionnalité inhibitrice et (3) d'identifier des marqueurs moléculaires (protéines et métabolites) de cette fonctionnalité.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. CONSTITUTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ET PREPARATION DU MICROCOSME FROMAGER

Trente-neuf isolats de bactéries et 50 de levures ont été identifiés à partir d'une communauté microbienne présente à la surface d'un fromage Livarot présentant une activité inhibitrice envers *Listeria monocytogenes*. Ces isolats ont été utilisés pour la construction, par addition (souches ajoutées une à une) ou par érosion (simplification progressive de

communautés initialement très diversifiées), de communautés microbiennes modèles, de complexité variable. Les potentialités inhibitrices envers *Listeria monocytogenes* WSLC 1685 (Scott A) de ces communautés modèles ont été déterminées. Pour cela, ces dernières ont été ensemencées, à hauteur de 10^5 levures et 10^8 bactéries/cm², en surface d'un milieu gélosé au Livarot (adapté de Guichard et Bonnarne, 2006), coulé en microplaques 96 puits (ou en boîtes de Petri de diamètre 90 mm pour les analyses chimiques et biochimiques décrites ci-dessous). Ainsi a été obtenue une simulation à échelle réduite (=microcosme) de l'écosystème fromager (milieu et communautés microbiennes). *Listeria monocytogenes* WSLC 1685 y a été co-inoculée avec les communautés à raison de 10^2 ufc/cm². Afin de mimer des conditions d'affinage, les microcosmes ont été incubés à 15°C (98% humidité relative), pendant 5 à 14 jours, selon les essais. Seule la croissance de *Listeria monocytogenes* a été déterminée dans ces essais, par utilisation d'un milieu de culture sélectif (Oxford). Les résultats obtenus ont été comparés à un témoin dans lequel *Listeria monocytogenes* était co-inoculée avec une souche non inhibitrice de *Geotrichum candidum*, levure utilisée au cours de l'incubation pour obtenir une remontée de pH similaire à celle obtenue à la surface du Livarot. C'est donc une réduction de croissance de *Listeria monocytogenes* par rapport au témoin qui a été étudiée. Pour chaque communauté testée, les essais ont été réalisés trois fois de façon indépendante.

1.2. SUIVI DES POPULATIONS ET ANALYSES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

Deux communautés à six membres ont été sélectionnées. La croissance de l'ensemble des souches y a été déterminée par utilisation de milieux de culture sélectifs et par PCR en temps réel, après 3, 5, 8 et 14 jours d'incubation. Afin d'évaluer le rôle individuel des souches dans l'inhibition de *Listeria monocytogenes*, chacune a été omise tour à tour de la communauté initiale, générant ainsi une communauté réduite, et la croissance de *L. monocytogenes* y a été suivie au cours de l'incubation.

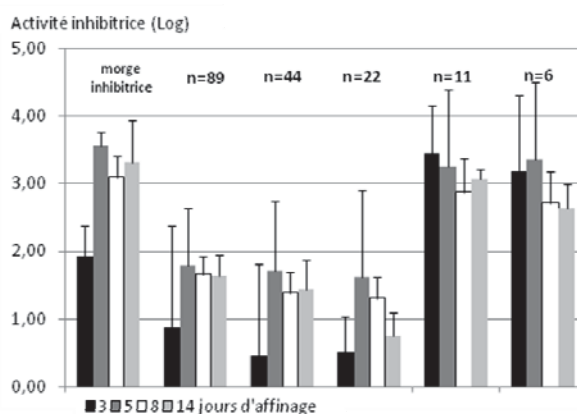
Pour une communauté sélectionnée, les profils métaboliques (analysés par dosages enzymatiques et GC-MS) et métagénomiques (analyse du protéome extracellulaire hydrosoluble par électrophorèse 2D-MALDI TOF/TOF) ont été déterminés après 3 et 5 jours d'incubation, en présence/absence de *L. monocytogenes* WSLC 1685. Dans le cas de l'analyse métagénomique, la communauté microbienne (en surface du microcosme) était séparée physiquement de *L. monocytogenes* WSLC 1685 (en dessous) par une membrane de nitrocellulose (Protran BA85, Whatman, pores de diamètre 0,2 µm).

2. RESULTATS

2.1. ACTIVITE INHIBITRICE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES CONSTRUITES

Par comparaison avec la morge naturellement inhibitrice dont était initialement issus les isolats, la construction par érosion de communautés microbiennes composées de 89, 44, 22, 11 puis 6 isolats a permis d'obtenir une inhibition variable de *L. monocytogenes* WSLC 1685 (Figure 1). Une inhibition d'intensité comparable à celle de la morge inhibitrice a été obtenue avec des communautés composées de 11 et 6 membres. Dans le cas de l'approche par addition, des communautés à 2, 3, 4, 5 et 6 membres ont été testées. L'inhibition la plus importante dans ce cas a été obtenue avec les communautés de 5 et 6 membres.

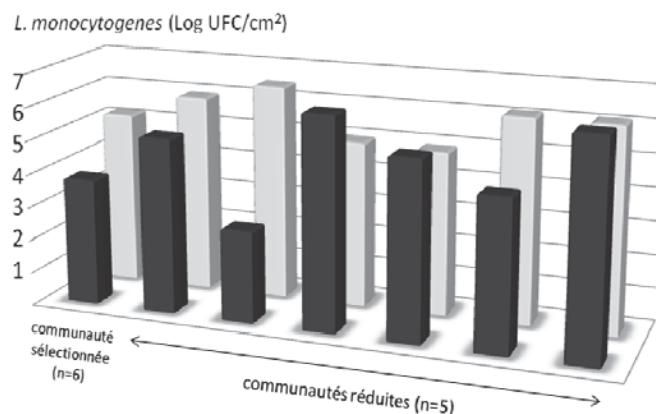
Figure 1 : Activité inhibitrice (Log) d'une morge inhibitrice et de communautés microbiennes de complexité décroissante (de n=89 jusqu'à n=6 membres) vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* WSLC1685 en microcosme fromager



2.2. ROLE DES SOUCHES DANS L'ACTIVITE INHIBITRICE AU SEIN DE COMMUNAUTES MICROBIENNES SELECTIONNEES

Deux communautés à 6 membres, présentant une forte activité inhibitrice, et composée chacune de deux levures (dont une souche de *Geotrichum candidum*), deux bactéries à Gram négatif et deux bactéries à Gram positif ont été sélectionnées. Le suivi dynamique des souches au cours de l'affinage a montré qu'elles se sont toutes bien établies. Certaines variations dans l'activité anti-*Listeria* ont été observées, surtout après 3 jours d'incubation, après omission de souches appartenant aux espèces *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter arilaitensis* et *Staphylococcus equorum*. Cependant, globalement, et surtout à partir du cinquième jour jusqu'au 14^{ème} jour d'incubation, l'omission successive de chacune des six souches dans les communautés ne modifiait pas de façon significative la croissance de *Listeria monocytogenes* (Fig. 2). L'inhibition observée n'était pas attribuable à un effet du pH.

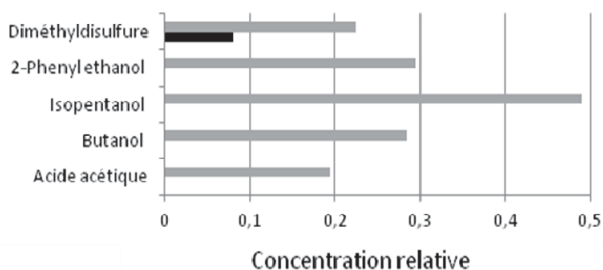
Figure 2 : Croissance (Log UFC/cm²), après 3 (■) et 5 (□) jours d'incubation à 15°C, de *Listeria monocytogenes* WSLC1685 en microcosme fromager en présence d'une communauté microbienne modèle (n=6 membres) et des communautés microbiennes réduites (n=5 membres) obtenues par omission successive de chacun des 6 membres de la communauté modèle



2.3. RECHERCHE DE MARQUEURS DE L'ACTIVITE INHIBITRICE

La communauté à 6 membres obtenue par érosion a été sélectionnée. Les profils métabolique et métoprotéomique de cette communauté seule, ou en présence de *L. monocytogenes* ont été comparés. L'expression, par la communauté, de protéines de stress et de diverses enzymes augmentait de manière significative en présence de *L. monocytogenes* WSLC 1685, indiquant que la communauté perçoit comme un stress la présence de cette bactérie, vraisemblablement en raison d'une compétition nutritionnelle.

Figure 3 : Métabolites produits en absence (■) et en présence (■) de *L. monocytogenes* WSLC 1685, par une communauté microbienne modèle (n=6 membres) en microcosme fromager



Une augmentation de la production de certains composés volatils (Figure 3), notamment des alcools, du diméthylsulfure mais aussi d'acide acétique était également observable, signe de possibles modifications dans les voies métaboliques empruntées par les membres de la communauté dans le cadre de la compétition avec *L. monocytogenes* WSLC 1685.

3. DISCUSSION

Un effet inhibiteur exprimé naturellement par une morge complexe a pu être reproduit à l'aide de communautés modèles reconstituées, en microcosme fromager. Nous avons qualifié l'effet obtenu d'effet barrière car il n'est pas attribuable à la production de bactériocines par les souches étudiées individuellement (Imran *et al*, 2010). Ce ne sont pas les communautés modèles les plus complexes qui ont donné les meilleurs résultats, ceci suggère qu'à défaut d'un nombre critique de souches, c'est une association adéquate entre ces dernières (équilibre favorable) qui pourrait être à l'origine de l'activité inhibitrice. Une hypothèse possible est l'existence d'une complémentarité métabolique des trois groupes constituant ces communautés, à savoir: des levures, des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif. Le fait que le nombre de souches impliquées dans les communautés modèles ne soit pas un facteur clé permettant d'expliquer l'effet barrière exercé vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, conduit également à penser que les mécanismes de compétition rencontrés sont spécifiques (Imran *et al*, 2012).

CONCLUSION

Il a été mis en avant que, plus que la complexité, c'est l'obtention d'un équilibre favorable qui permet l'obtention de l'effet barrière. Cet effet semble pouvoir être expliqué par des phénomènes de compétition nutritionnelle spécifiques entre la communauté et *L. monocytogenes*, dont les mécanismes sont en cours d'étude.

Les auteurs remercient le Prof. Siegfried Scherer pour avoir aimablement fourni la souche *L. monocytogenes* WSLC 1685. Est également remerciée la "Higher Education Commission of Pakistan" (HEC) pour avoir contribué à cette étude en finançant la bourse de thèse de Muhammad Imran. Une partie de ce travail a reçu le soutien financier du Conseil Régional de Basse-Normandie.

- Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., Montel, M.-C., 2007. Syst. Appl. Microbiol., 30, 547-560
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M., Scherer, S., 1997. Appl. Env. Microbiol., 63, 4812-4817
- Guichard, H., Bonnarne, P., 2006. Anal. Biochem., 338, 299-305
- Imran, M., Desmasures, N., Vernoux, J.-P., 2010. Food Microbiol., 27, 1095-1103
- Imran, M., Bré, J.-M., Guéguen, M., Vernoux, J.-P., Desmasures, N., 2012. Food Microbiol., <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.008>
- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., Desmasures, N., 2012. Int. Dairy J., <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.07.009>
- Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y., 2011. Int. J. Food Microbiol., 146, 253-262
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., Montel, M.-C. 2012. Appl. Env. Microbiol., 78, 326-33

