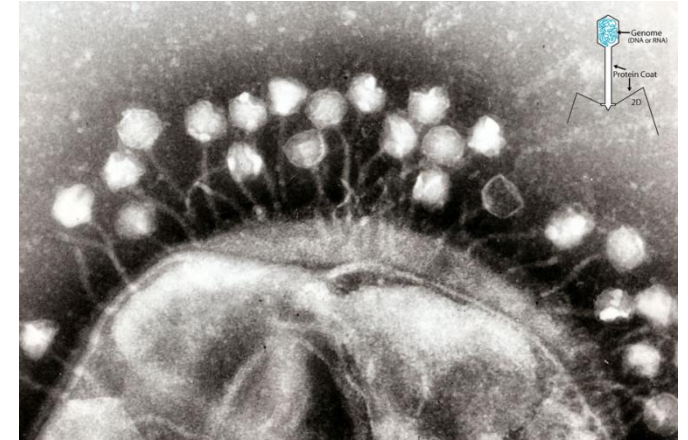




# Les phages dans la fabrication de fromage



**Noam Shani, Helena Stoffers, Ernst Jakob, Carlotta Sartori,  
John Haldemann, Thomas Aeschlimann, Nicolas Fehér**

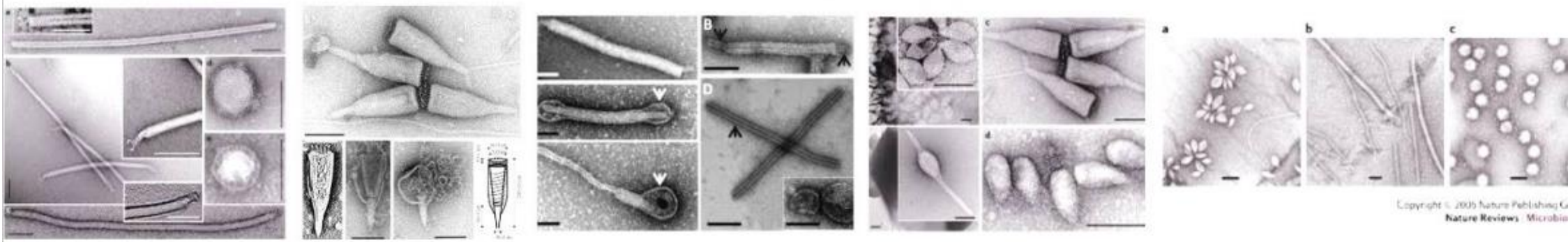
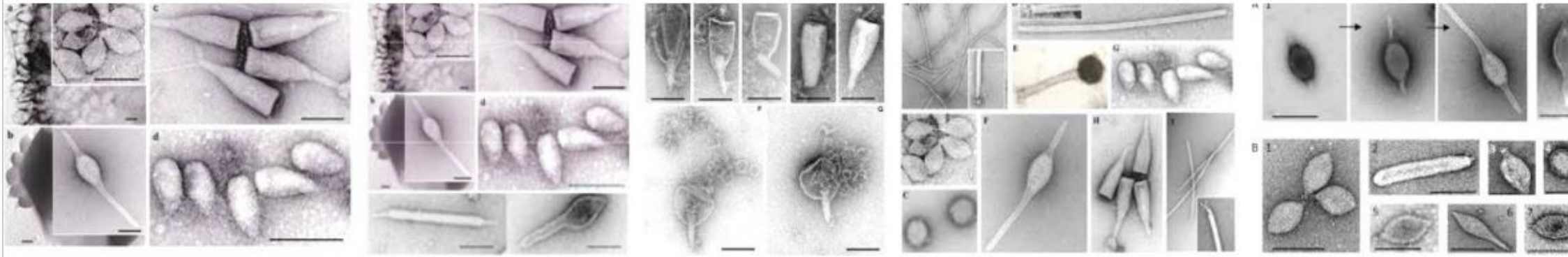
Friseneit, le 28 novembre 2024



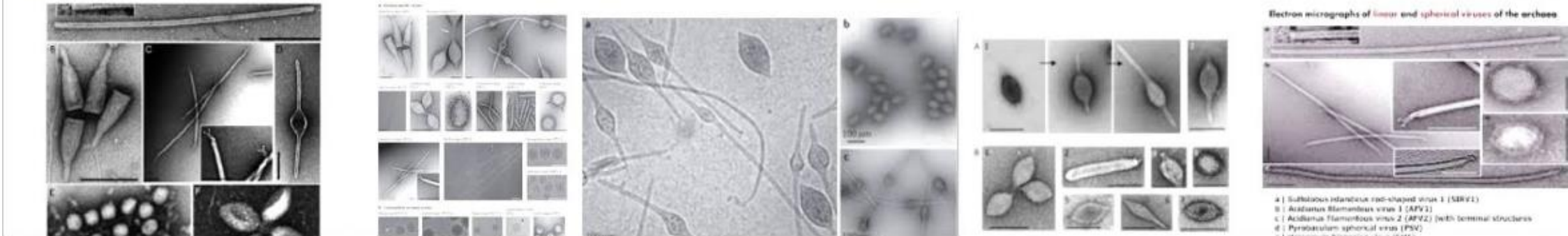
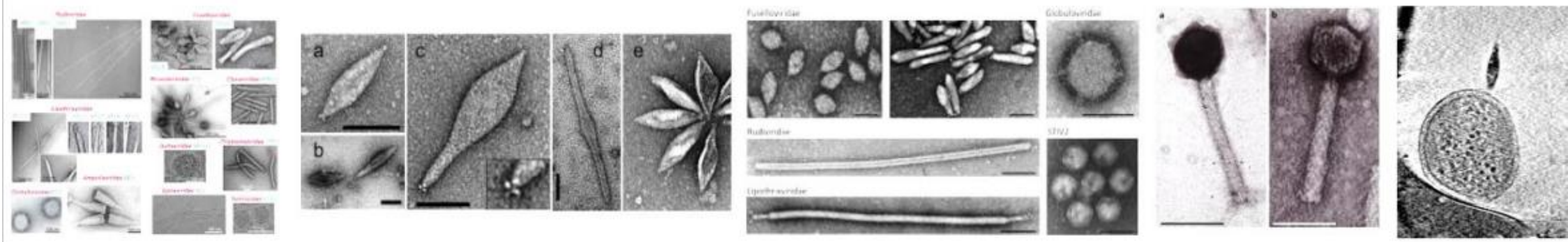
# Qu'est-ce que les bactériophages ?



Les phages dans la fabrication de fromage  
Friseneit, le 28 novembre 2024



Copyright © 2005 Nature Publishing G  
Nature Reviews - Microbio



Electron micrographs of linear and spherical viruses of the archaea

a | Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 1 (SIRV1)  
b | Acidilobus filamentosus virus 1 (AFV1)  
c | Acidilobus filamentosus virus 2 (AFV2) [with terminal structures]  
d | Pyrobacculum spherical virus (PSV)

PD Dr.  
Wolfgang  
Beyer  
Universität  
Hohenheim  
homepage:  
uniho-beyer.de



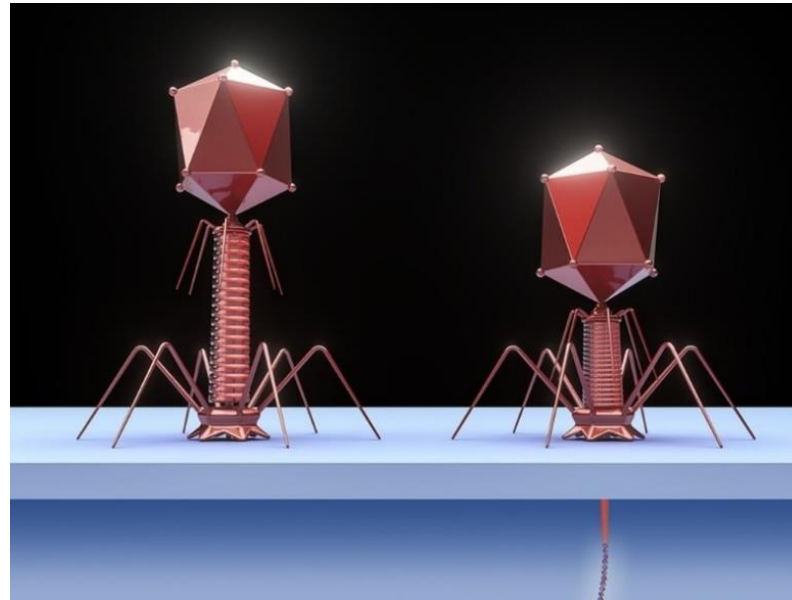
# Qu'est-ce que les bactériophages?

- Organismes microscopiques présents **partout** où il y a des bactéries.
- Ils ont besoin d'un **hôte bactérien approprié** pour se reproduire.
- Rôle très **important dans les écosystèmes** (favorisent la biodiversité, régulent les populations de bactéries, etc.)
- Une cuve remplie de lait avec des cultures est le **paradis des phages**.
- Une étude dans des fromageries en Irlande a montré que **plus de 60% des petits-laits** collectés contiennent des phages.



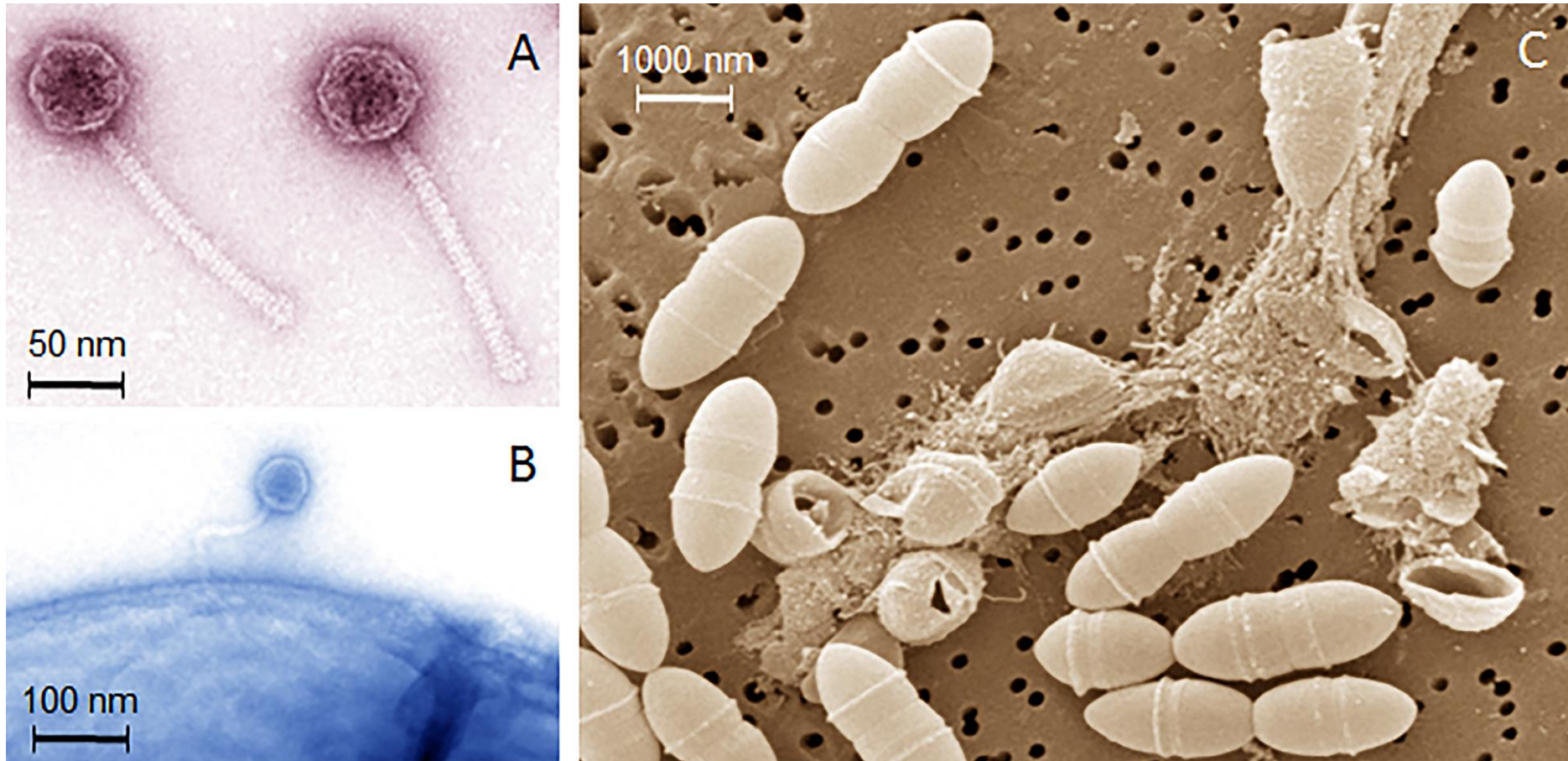
# Qu'est-ce que les bactériophages?

- **Organismes simples** : ADN dans une enveloppe de protéines.
- **Caused des fermentations lentes ou échouées.**
- **Peuvent altérer les propriétés du produit.**
- **Les mêmes phages peuvent rester des années** dans une fromagerie.





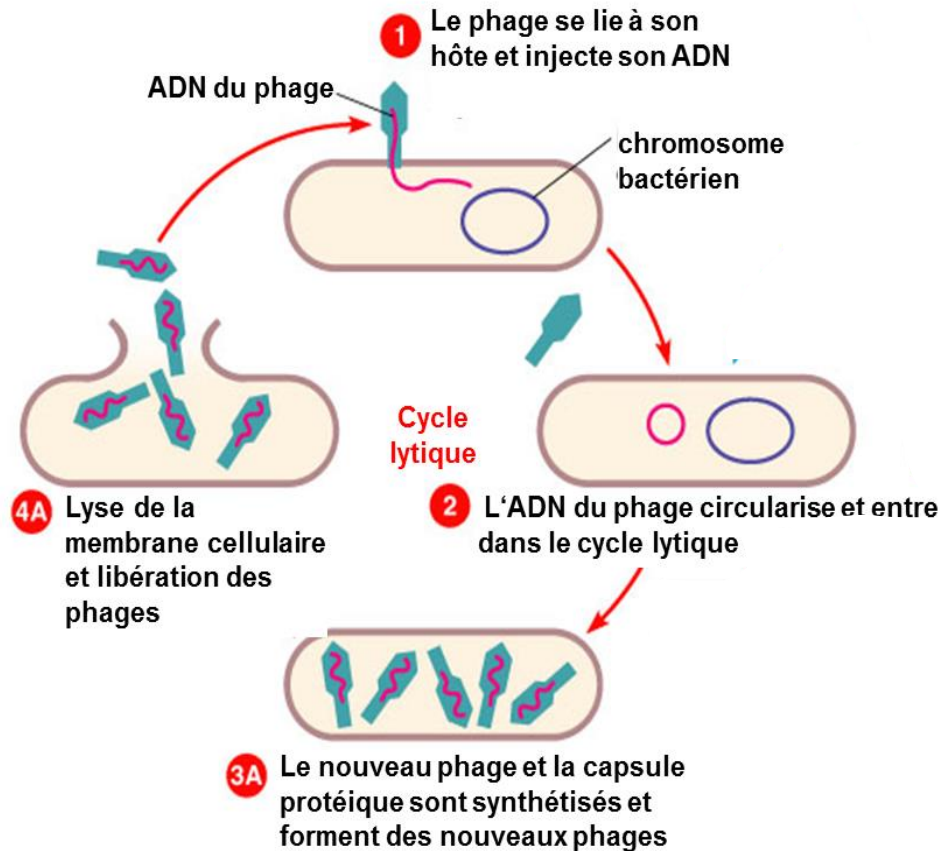
# Les phages attaquent et détruisent les bactéries lactiques



Photos prises au microscope électronique (A) de bactériophages de bactéries lactiques, (B) d'un seul phage après fixation (adsorption) à la surface cellulaire d'une bactérie lactique et (C) du début de la destruction des cellules bactériennes par les phages. Illustration : Dr Horst Neve, Institut Max Rubner



# Cycle de reproduction lytique et lysogénique par le biais de cellules bactériennes

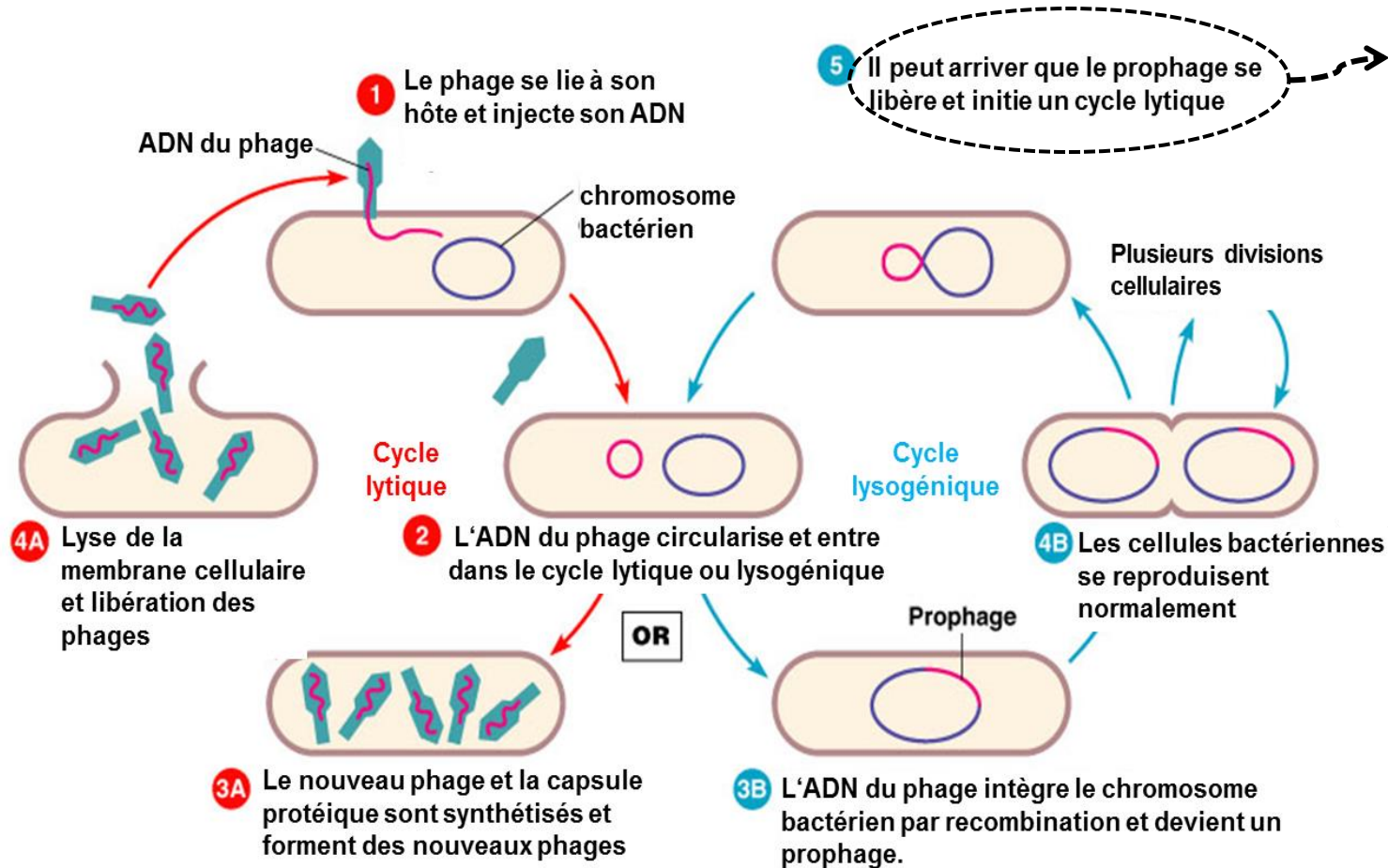


1 cellule => plusieurs centaines phages  
1 phage => peut ainsi donner naissance à  
100 milliards de phages, en moins d'1h !

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



# Cycle de reproduction lytique et lysogénique par le biais de cellules bactériennes



Les facteurs déclenchants sont:

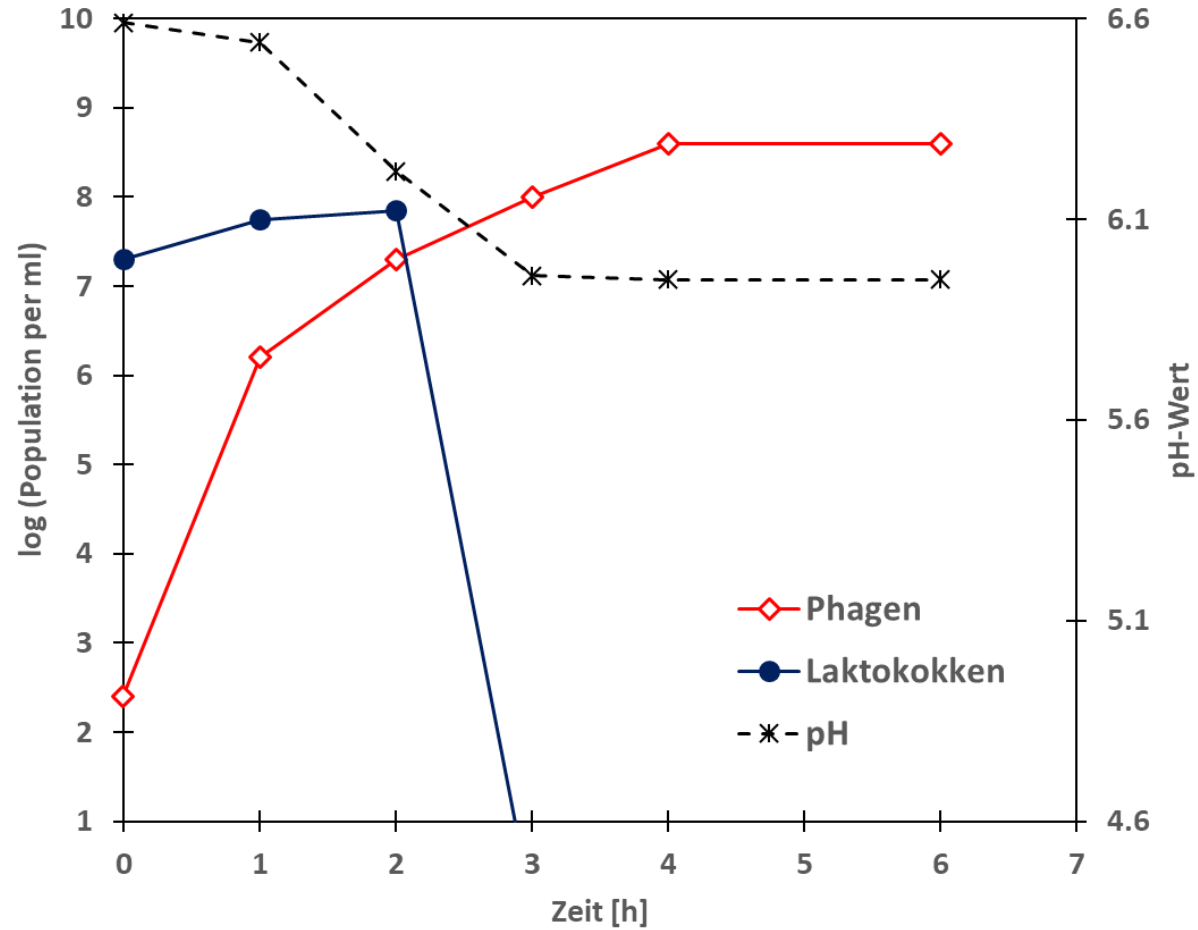
- Stress dû à la chaleur
- Manque de substances nutritives
- Concentration en sel élevée
- Stress du au pH
- Substance antimicrobienne
- Rayonnement UV...

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.





# Multiplication d'une souche de Lactococcus et de son phage dans du perméat de lait



nach Atamer et al.,  
2009. Deutsche  
Milchwirtschaft, 60  
(3) 84-88)



# Effets négatifs des phages sur la qualité des Gruyère



## Bactéries lactiques thermophiles

Bactéries phagées	Défauts	Contrôles
<b><i>Streptococcus thermophilus</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Début d'acidification plus lent</li><li>• Courbe pH en générale plus lente</li><li>• Perturbe aussi les Lb</li></ul>	Consistance des fromages pH 2h, 4h, 24h acides lactiques L+ et D- acidité et microscopie des cultures
<b><i>Lactobacillus delbruecki ssp. lactis</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mauvaise couverture acide = arôme déviant, mauvaise conservation</li><li>• Moins de protéolyse = goût fade, pâte sablonneuse</li><li>• Manque de concurrence face aux autres Lb. = formation ouverture par Lb. hétéro.</li><li>• Problèmes d'arômes</li></ul>	Consistance des fromages pH 2h, 4h, <b>8h</b> , 24h valeur LAP acides lactiques totales, L+ et D- acidité et microscopie des cultures Galactose, brunissement
<b><i>Lactobacillus helveticus</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Moins de protéolyse → moins d'arôme</li></ul>	valeur LAP acides lactiques L+ et D- acidité et microscopie des cultures



# Phages dans le petit-lait mûri

	Phages isolés de petit-lait de différentes fromageries Gruyère							
	4218	4402	4397	4122	4217	4223	4345	4384
Souches de de la culture AOP-G1	A	B	C	D	E	F	G	H
FAM 19109	+++	+	+++	+	+	-	+	+++
FAM 19112	+	+	+	+	+	+	-	-
FAM 19108	+	-	-	-	-	-	-	-
FAM 19110	-	+	-	-	-	-	-	-
FAM 19113	-	-	-	-	-	-	-	-

Souche décimée par tous les PL (sauf F)

Souche résistante à tous les PL (sauf F)

Réduction de la croissance: ++ > 40%; + = 10-39%; - pas d'inhibition



# L'avantage des cultures mixtes brutes (CMB)



Les souches des CMB:

- ont été isolées de cultures sur petit-lait, un **écosystème** largement adapté aux phages.
- sont **naturellement robustes** aux phages et disposent de mécanismes de protection.
- contiennent une **multitude de souches** dont le spectre est différent.

La CMB permet en règle générale de terminer une acidification même lors de très fortes perturbations provoquées par des phages.

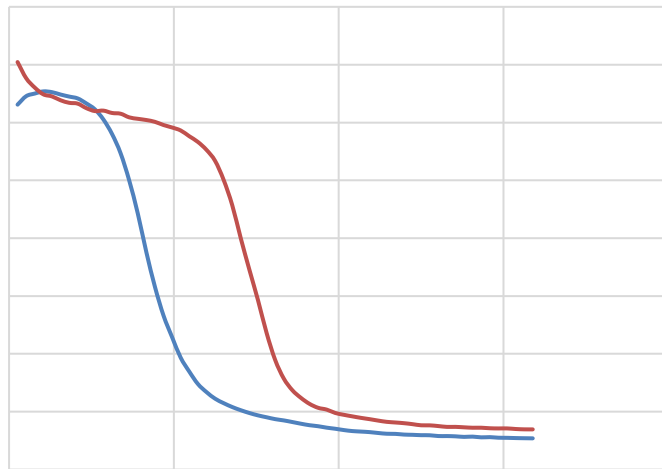


# Cas pratique: problème de phage avec la CMB

## Courbe pH

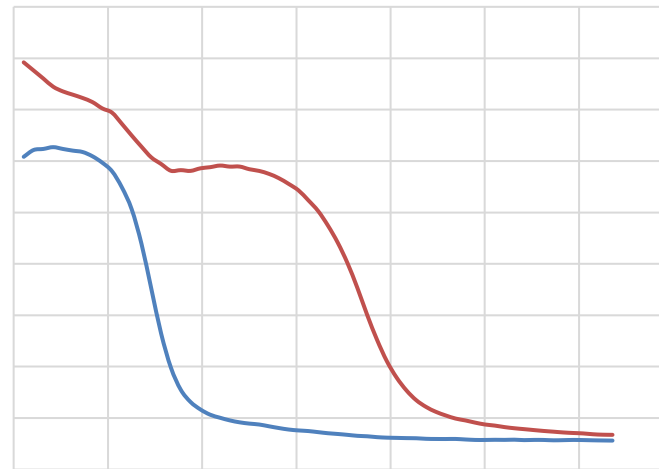
➤ Petit-lait de la cuve incubée avec les cultures

280, 1%, 37°C



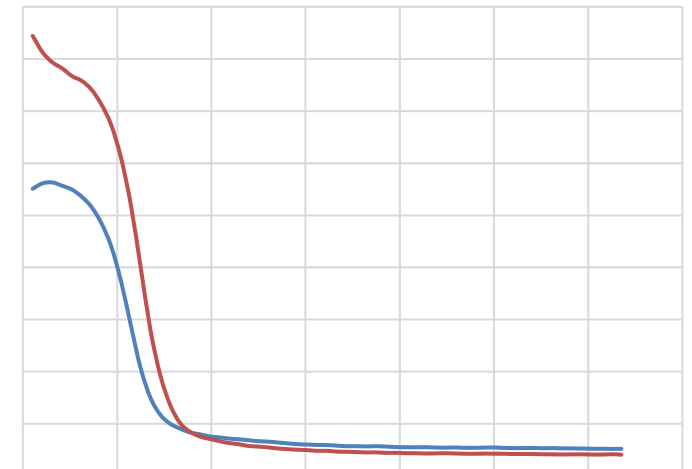
— 280 1% — 280 1% et petit-lait

291, 1%, 37°C



— 291 1% — 291 1% et petit-lait

BAMOS 1% 37°C



— BAMOS 1% — BAMOS 1% et petit-lait

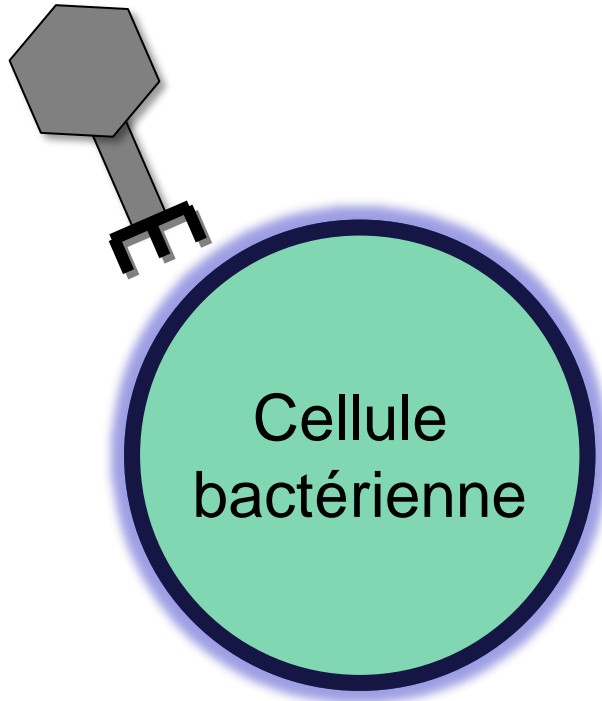


# Effets négatifs des phages sur la qualité des Vacherins fribourgeois

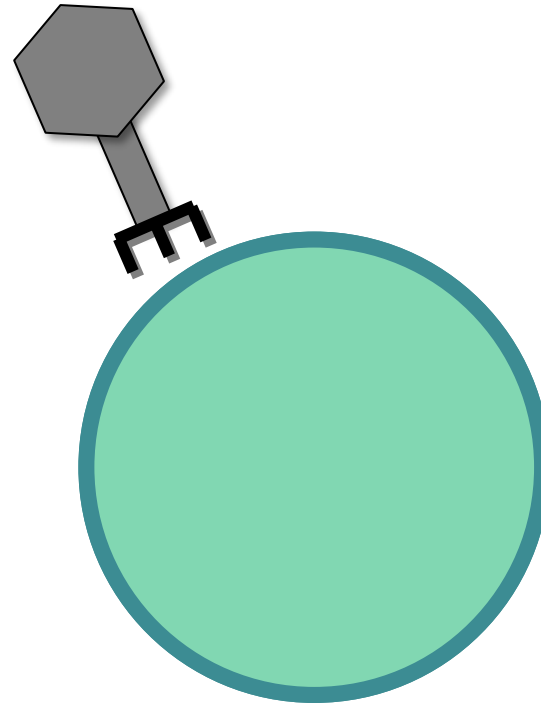
<b>Bactéries lactiques mésophiles</b>		
Bactéries lactiques phagée	Défaut	Contrôle & valeurs cibles
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Début d'acidification plus lent</li><li>• Courbe pH en générale plus lente</li><li>• Coupure d'acidification</li></ul>	pH 2h, 4h, 6h, 24h acidité des cultures Galactose < 5 mmol/kg
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Arôme déviant : souvent défaut d'arôme, fade, amertume, etc.</li><li>• Moins de protéolyse</li></ul>	pH 24h > 5,00pH Citrate < 2mmol/kg OPA à 4 mois > 150 mmol/kg acidité des cultures
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Moins de protéolyse → moins d'arôme</li></ul>	-



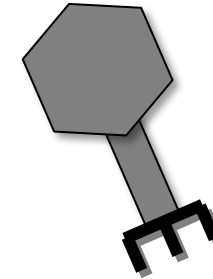
# Mécanismes de défense des bactéries contre les phages



Modification de l'enveloppe cellulaire  
(le virus ne peut plus se fixer).



La substance virale injectée est dégradée ou rendue non fonctionnelle



La cellule infectée s'autodétruit avant que le phage ne puisse se reproduire.

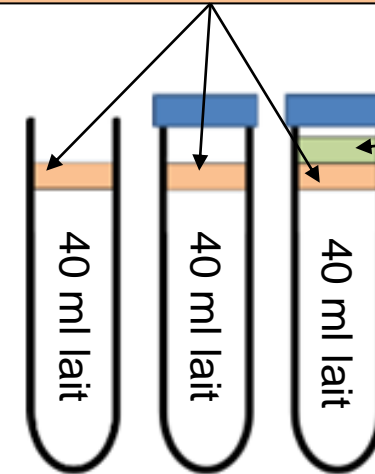


# Sensibilité de la culture à l'air et au petit-lait de la fromagerie

## Conception de l'essai



CMB :  
2,5‰ (0,1ml) culture  
d'exploitation



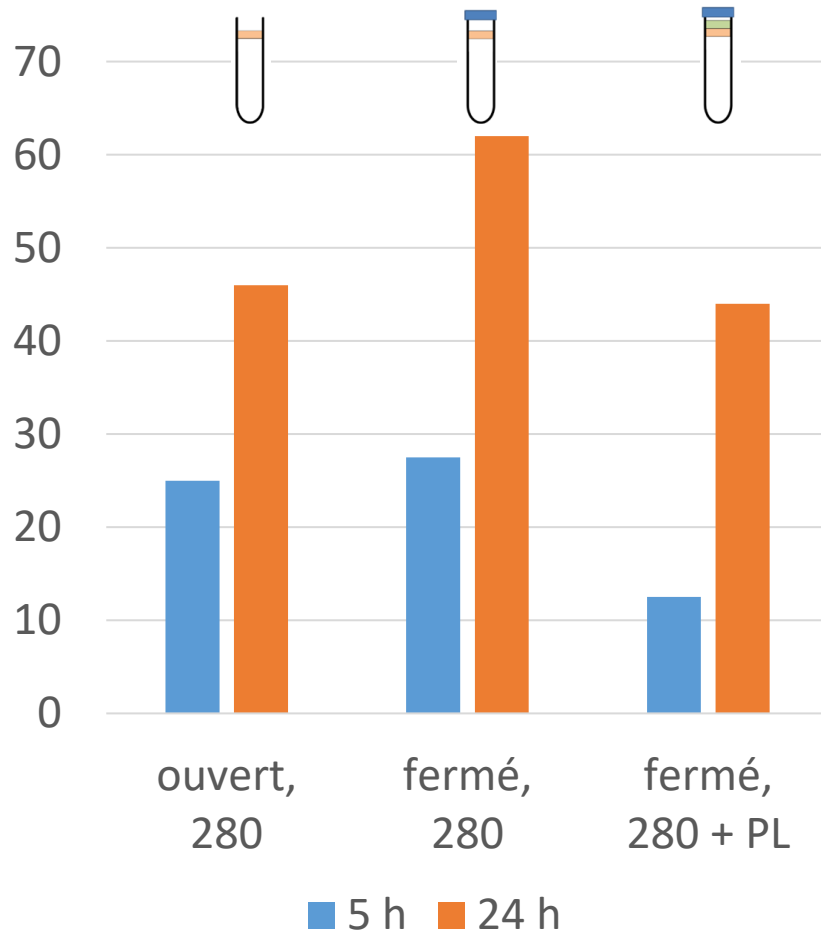
Petit-lait :  
2,5‰ (0,1ml) de  
la 1ère charge



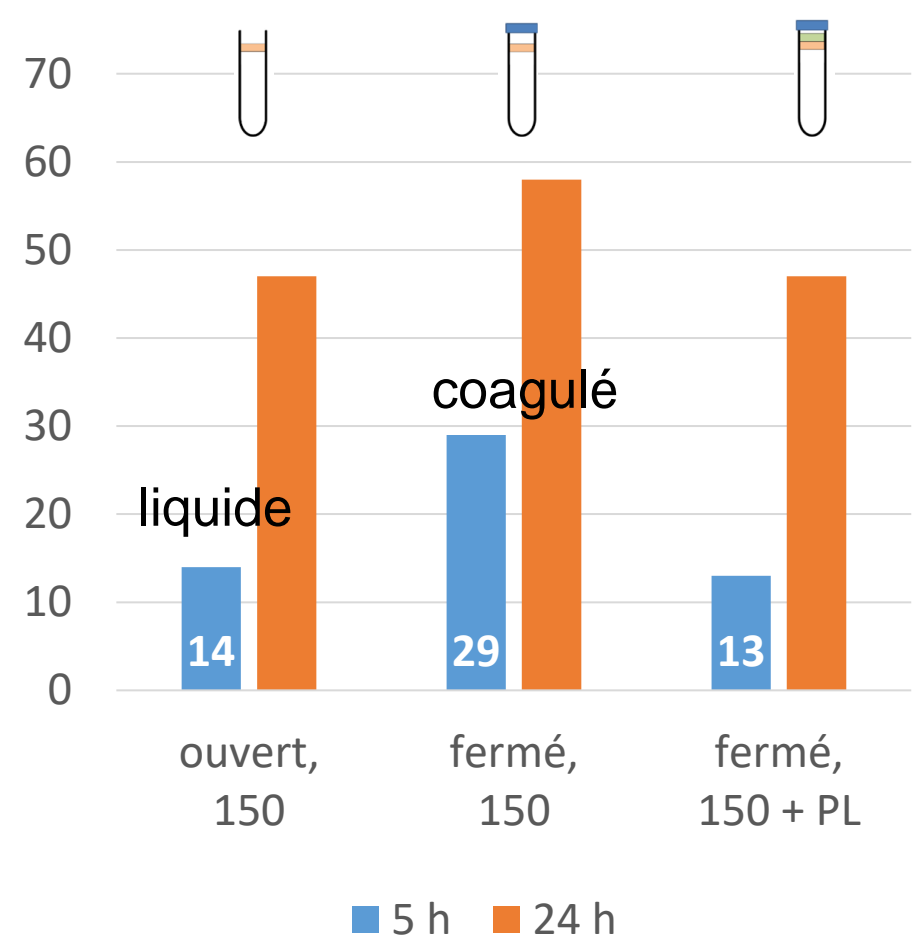


# Acidité des échantillons (°SH)

Lait cru & CMB 280  
maturation à 38°C



Lait cru & CMB 150  
maturation à 38°C





# Méthode rapide pour la détection de phages dans les fromageries



- Strips uniquement pour *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus lactis/cremoris*
- Méthode qPCR = détection génétique vivante ou morte



# Seuil de détection

TARGET	RESULT	Mesophage SQ (PARTICLES PER 20- $\mu$ L REACTION)	UNDILUTED DAIRY SAMPLE (PARTICLES PER mL)
	Detected - High	16,001 +	100,000,001+
	Detected - High/Medium	1,601-16,000	10,000,001 - 100,000,000
	Detected - Medium	161-1,600	1,000,001 - 10,000,000
	Detected - Low/Medium	17-160	100,001 - 1,000,000
	Detected - Low	1-16	10,001 - 100,000
	Not Detected	0	< 10,001

## Exemple pratique : résultats phages *Lactococcus* d'une fromagerie

Lait de cuve avec cultures, petit-lait de cuve décaillage, petit-lait sous presse début sortie, petit-lait tank



CIP soude 1, CIP soude 2

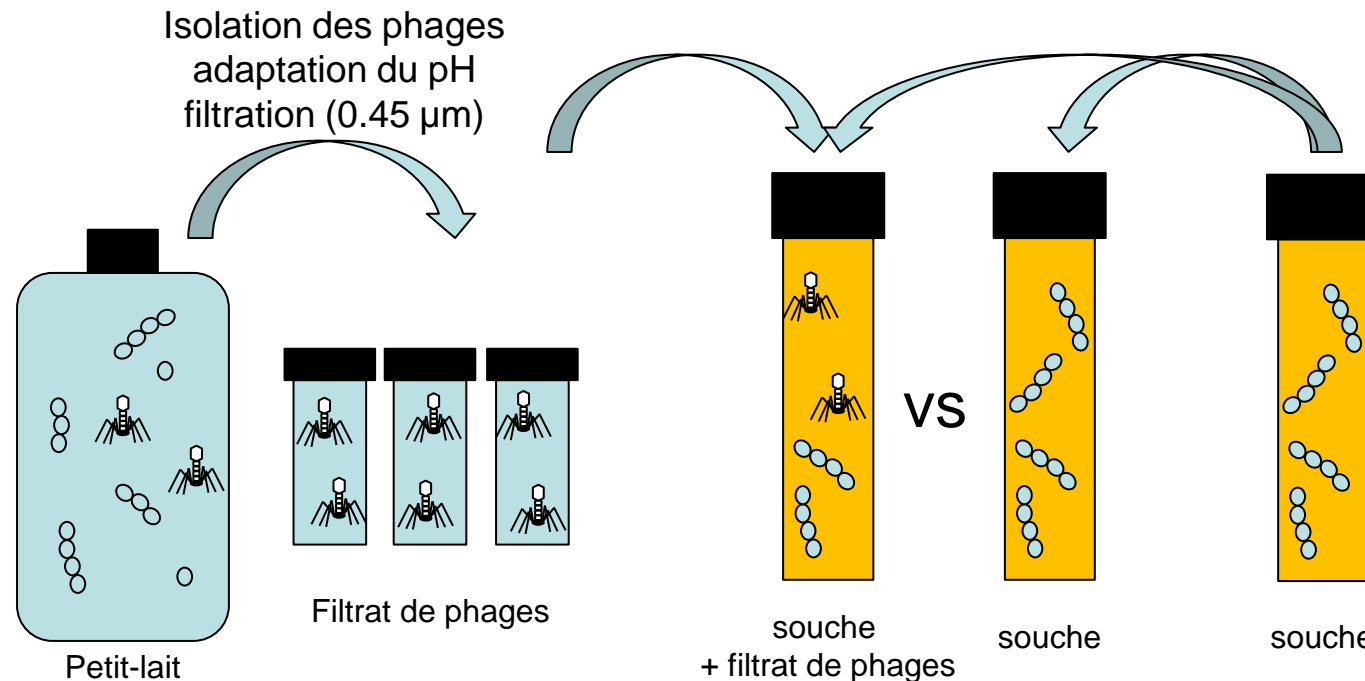
CIP acide 1, CIP acide 2, tous les laits des producteurs (matin). Lait de mélange tank, lait de cuve sans culture, cultures d'exploitation





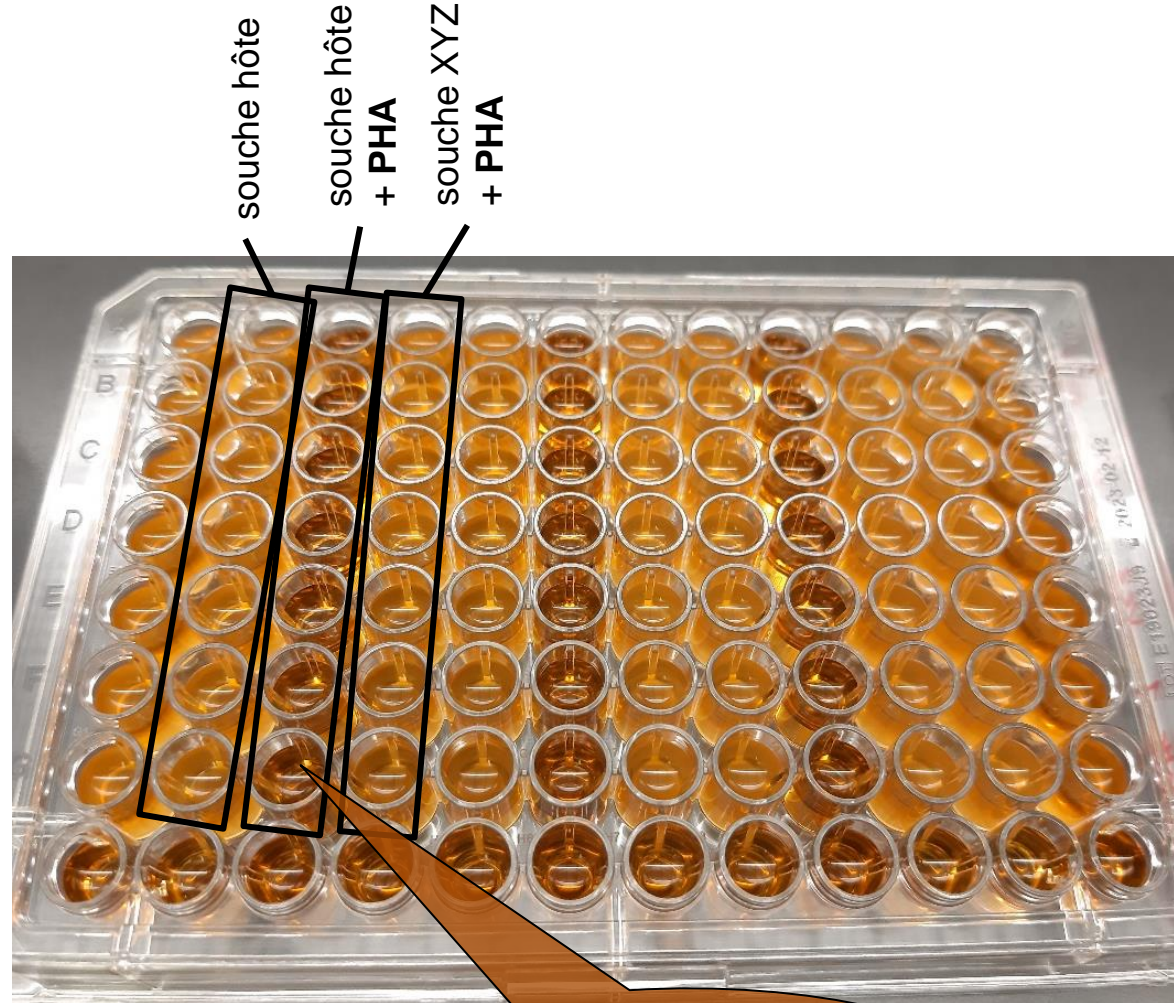
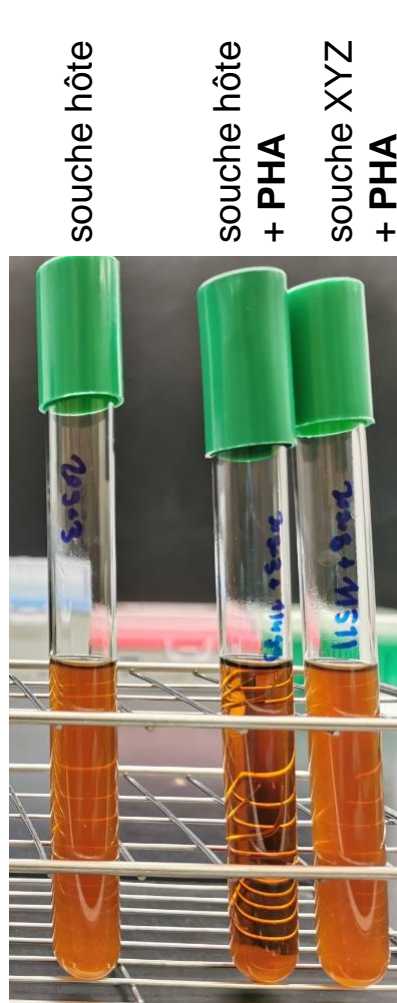
# Analyse de la sensibilité des souches individuelles

- **Cultures définies** → Souches hôtes bactériennes disponibles
- **Quelle est la sensibilité** d'une culture aux phages ?
- Le petit-lait suspectée est mis en contact avec des souches de la culture





# Analyse de la sensibilité des souches individuelles



La souche n'a pas poussé



# Analyse de la sensibilité des souches individuelles

«Courbe pH inversée»

souche x avec PHA    souche y avec PHA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
B	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
C	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
D	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
E	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
F	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩

Souche entièrement phagée

contrôle

Souche résistante aux phages

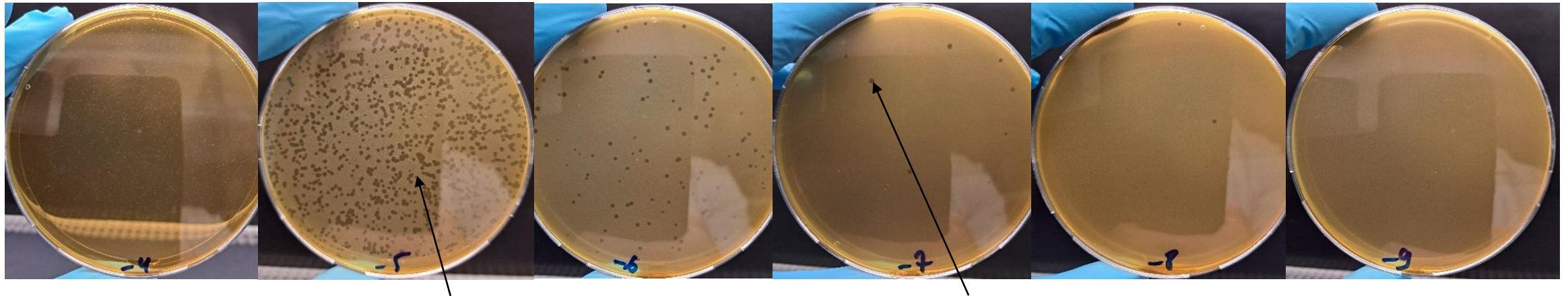
Retard de la croissance



# Compter et isoler les phages

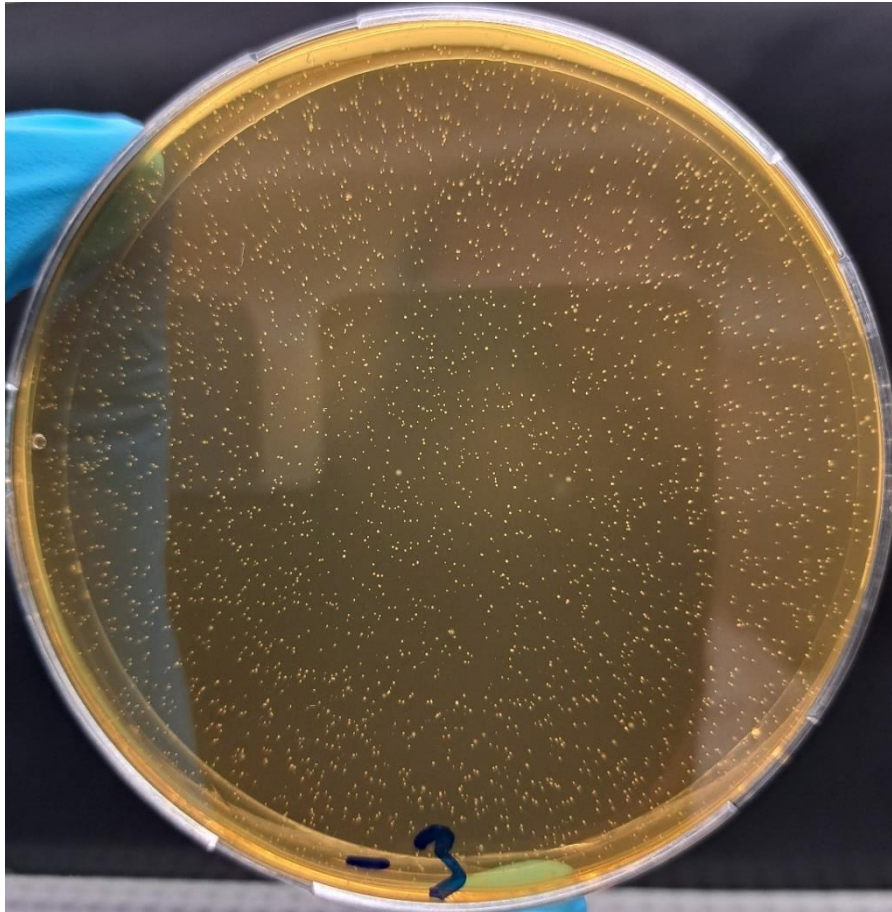
Les phages ont  
lysé toutes les  
bactéries

Aucune  
colonie n'a  
été lysée



Chaque trou est un phage qui s'est multiplié et à lyser les bactéries du tapis microbien

# Bacteriophage insensitive mutants (BIMs)



Mutation → Sous-populations  
naturellement  
résistantes

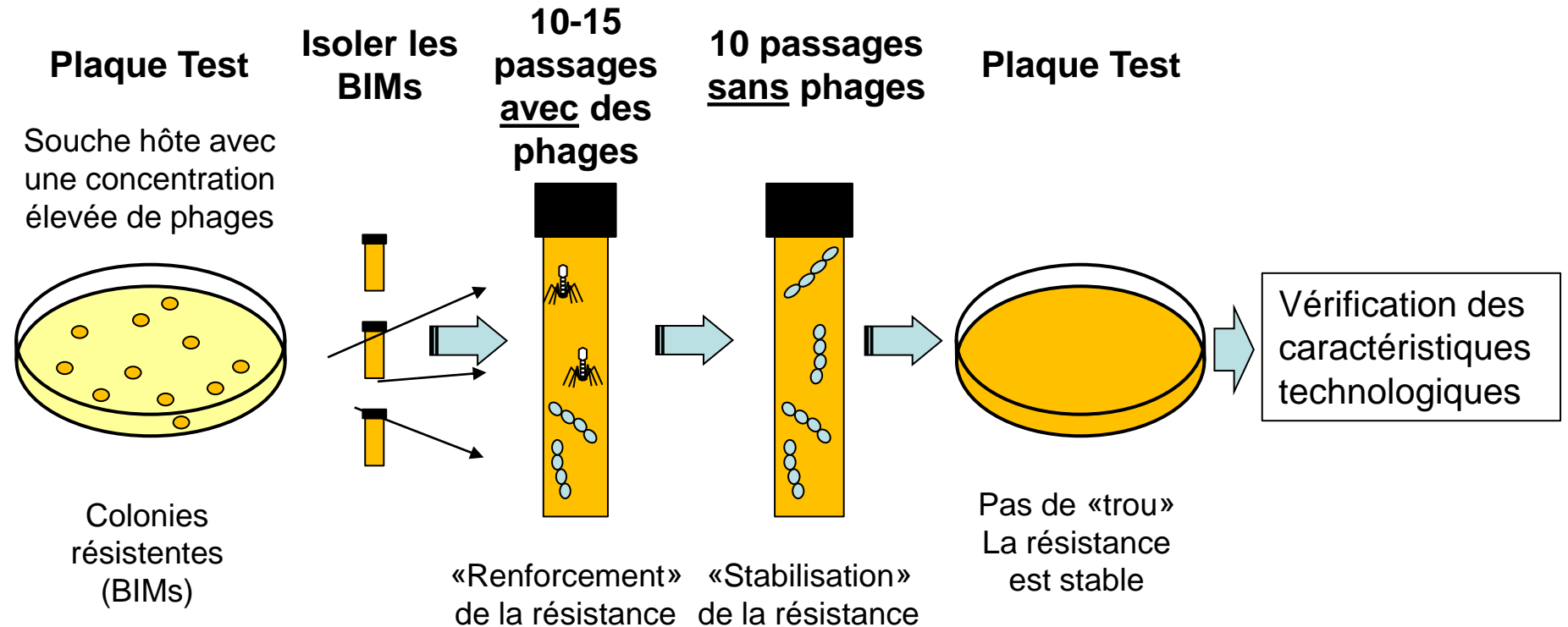




# Production de BIM's «Bacteriophage insensitive mutants»

## Condition préalable

- Phage isolé
- Souche hôte bactérienne





# Sources d'infection pour les bactéries lactiques

## Petit-lait = aérosols

- résidus dans la fromagerie, stockage, crème de petit-lait
- lactofermentateur et lactocoagulateur
- installations et matériels
- boues solution CIP alcaline

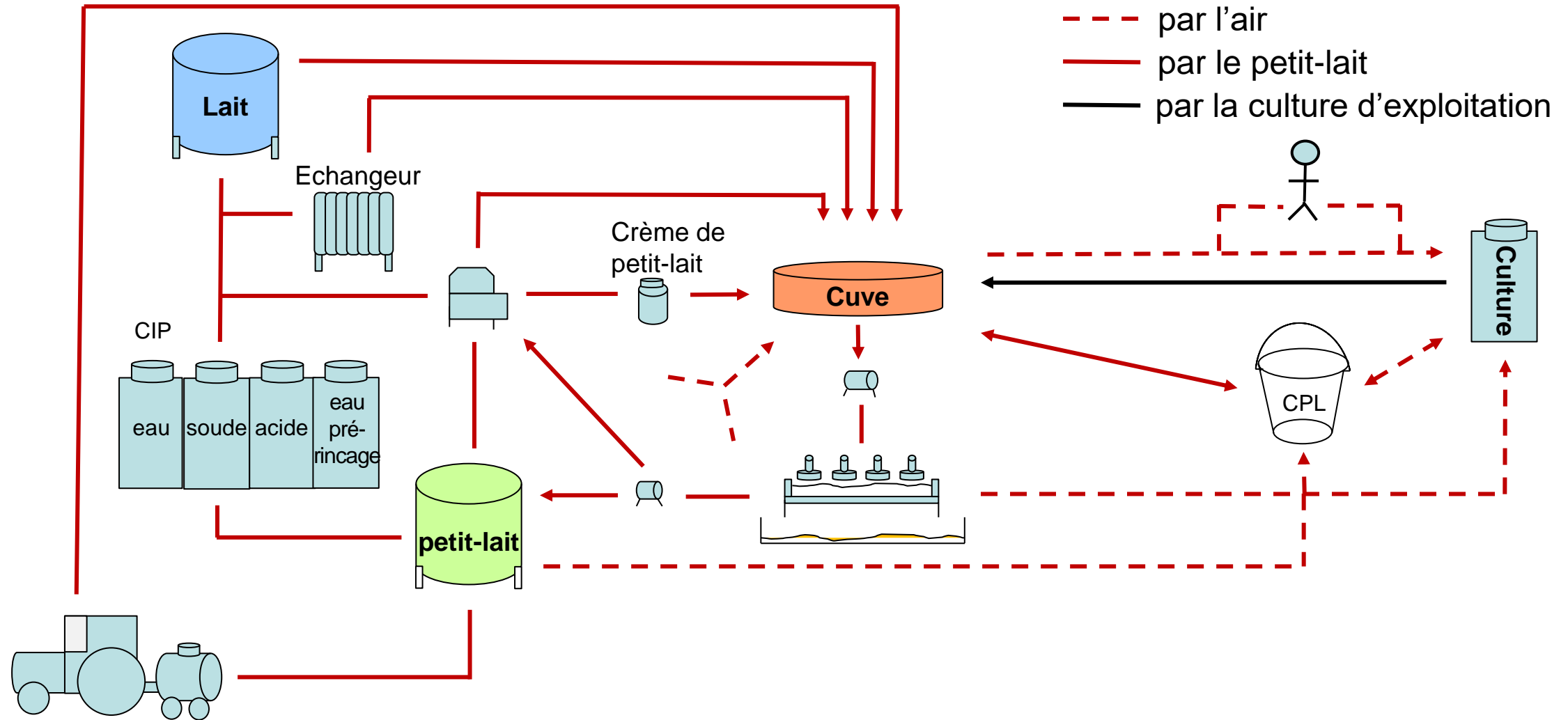
## Cultures

- cultures sur petit-lait
- prophages des cultures commerciales

**Lait** = surtout lors de la reprise de petit-lait par le producteur de lait

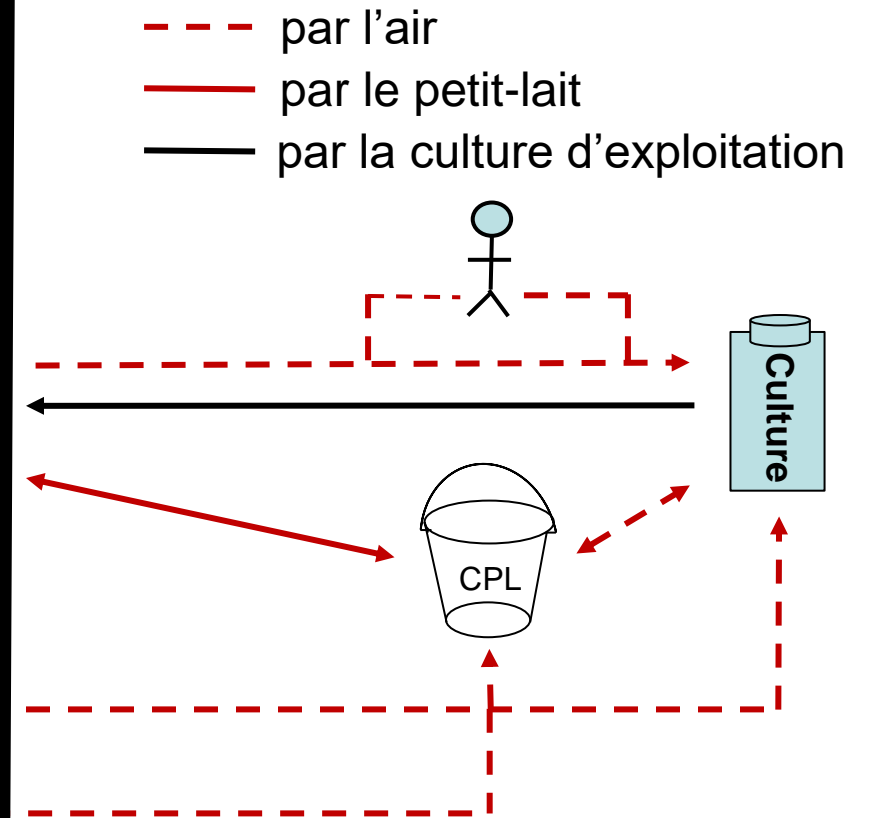
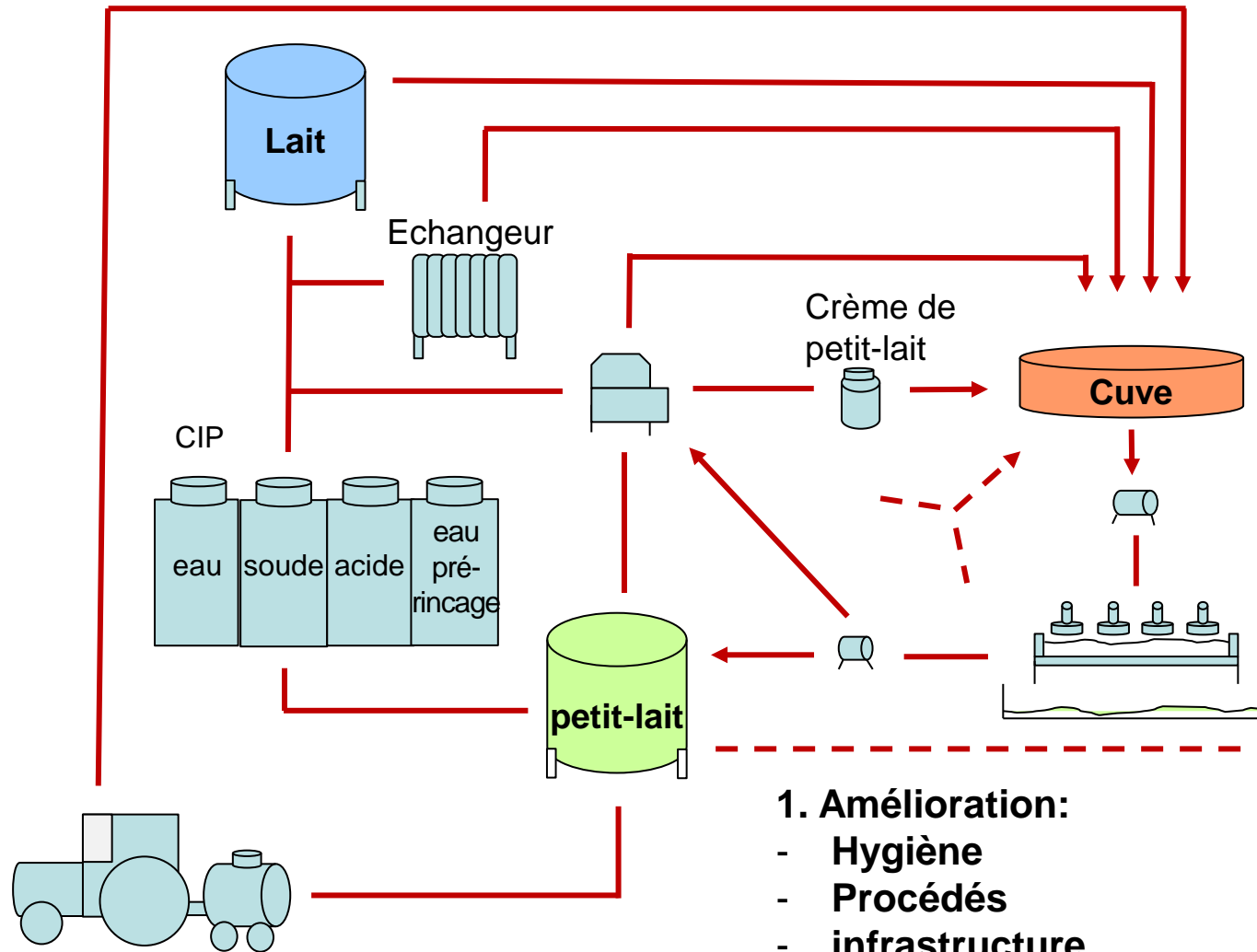


# Multiplication en circuits fermés ou cycles





# Multiplication en circuits fermés ou cycles



- 1. Amélioration:**
- Hygiène
  - Procédés
  - infrastructure

- 2. Amélioration:**
- Coupure du cycle par le changement des souches des cultures
  - Méthode préparation cultures



# Mesures contre les problèmes d'acidification liés aux phages (I)

Source des phages	Stratégie	Mesures
Fromagerie	Plan, aménagement, installation	Séparation des <b>zones</b> de fabrication Installations fermées (par ex. cuve fermée) Filtration de l'air Zone de fabrication en <b>surpression</b> Mesures pour <b>éviter les aérosols</b>
	Déroulement du processus	Optimisation des processus <b>Echelonnement</b> dans le temps Rotation des cultures
	Nettoyage / désinfection	Nettoyage/ <b>renouvellement</b> de la solution alcaline du CIP Nettoyage à l'acide en alternance <b>Désinfection</b> (acide péracétique ), UV Mesures pour éviter les aérosols
Lait cru	Microbiologie	L'entreposage <b>au frais</b> empêche la multiplication des phages
	Traitement du lait	Traitement thermique



# Mesures contre les problèmes d'acidification liés aux phages (II)

Source des phages	Stratégie	Mesures
<b>Cultures</b>	Cultures exemptes de phages	Utilisation de cultures résistantes Travail en conditions stériles <b>Local séparer</b> (surpression), hors de la zone de prod. Changement <b>d'habits</b> , désinfection des mains
	Interruption des cycles	<b>Rotation</b> des cultures
	Milieu de culture	Milieu de culture stérile Milieu spécial inhibiteur de phages/anti-phages (par ex. additifs liant le calcium tels que le citrate, polyphosphate, etc.)
	<b>Profil de phages différents</b>	Choix des cultures
<b>Recirculation des composants du lait</b>	Petit-lait	Mesures pour éviter la formation d'aérosols (lors du remplissage, nettoyage, etc.)
	Crème de petit-lait	Pasteurisation haute <b>Interruption du circuit une fois par semaine</b>
<b>Autres</b>	Reprise du petit-lait par les producteurs	Ne laisser aucun récipient de transport dans la fromagerie
	Entretien	Contrôler régulièrement les joints Contrôler si la citerne/cuve présente des fissures



# Conditions favorisant les phages dans les fromageries

- Pas de rotation des cultures.
- Utilisation de cultures d'exploitation, surtout avec des cultures définies.
- Pas de séparation spatiale du local de préparation de cultures et du local de fabrication.
- Fabrication de plusieurs charges dans la même journée.
- Réincorporation de crème de petit-lait dans la fabrication.
- Retour du petit-lait dans le local de fabrication (également vidange CIP tank petit-lait)
- CIP inadéquat (monophasé etc.) ou solution souillée
- Manque d'hygiène



# Mesures préventives dans les fromageries

## Généralités

- Séparation temporelle et spatiale et physique des processus délicats
- Flux de ventilation contrôlé, surpression : local des cultures et local de fabrication (cuve)

## Recette

- Préparer la culture d'exploitation acidifiée peu de temps avant de la verser dans la cuve.
- Raccourcir le temps de maturation en cuve. Lorsque le lait commence à cailler, les phages ne peuvent plus se propager facilement.
- Rotation des cultures
- Lorsque une culture définies (culture avec peu de souches) est phagée, ne plus utiliser la culture pendant une période prolongée.
- Pasteurisation haute de la crème de petit-lait lorsque celle-ci est réincorporée dans la cuve.





# Préparation des cultures d'exploitation

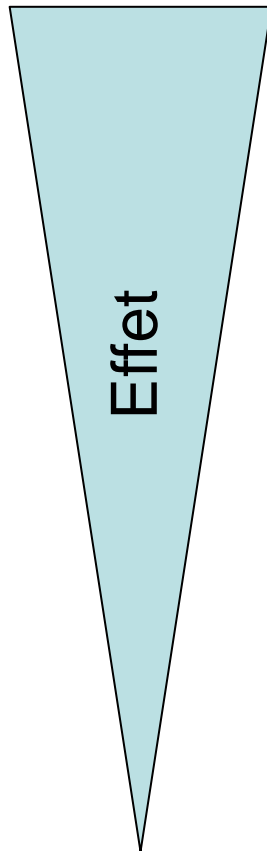
- **Endroit aéré**
- **A l'extérieur des locaux des productions (labo incl.)**
- **Habits et cheveux propres** (avant le passage à la fromagerie)

1. Laver les mains
2. Désinfecter à l'alcool : mains, sachet, brique de lait. Alcool 80 % ou isopropanol 70 %, temps d'action min 1min.
3. Allumer et placer le bec bunsen
4. Inoculer la culture dans la brique
5. Refermer
6. Retourner la brique plusieurs fois, ne pas secouer





# Efficacité des désinfectants pour l'inactivation des phages



Acide peracétique 0.15%

Hypochlorite de sodium 0.08 % *> 99% inactivé en < 2 min*

Alcool 75 %  
Alcool 100 %

*Généralement inactivé  
à 99% en < 10 min*

Alcool 50 %

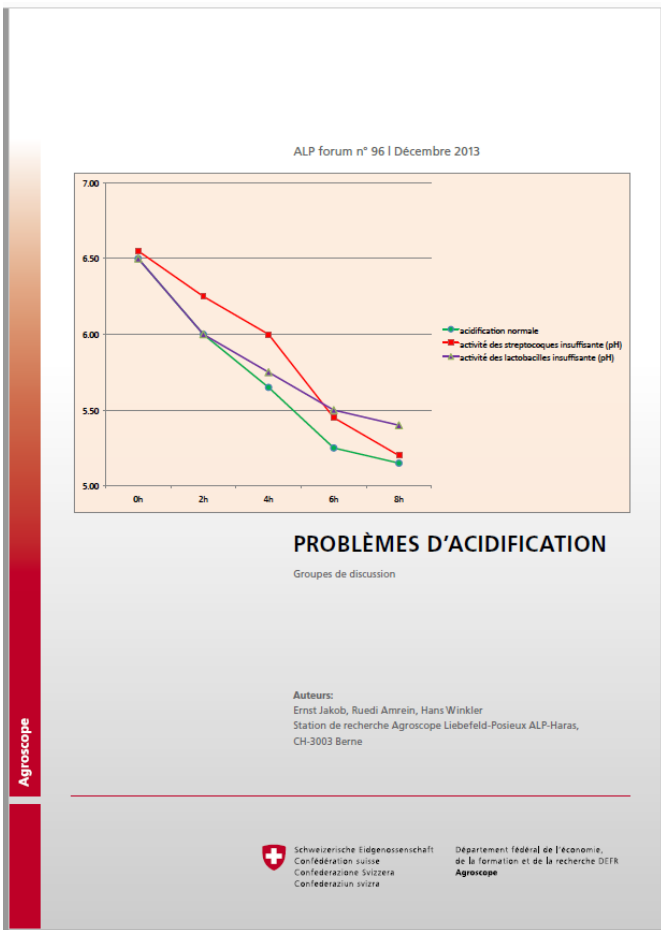
*Généralement moins de 99%  
d'inactivation en 15 minutes*

Source : Guglielmotti D.M. et al. Frontiers in Microbiology 2, Article282, 1-11, 2012



# Résumé

- Les bactériophages sont généralement **présents dans les cultures**, sous forme de phages libres, ou de prophages.
- Les phages virulents se **multiplient très rapidement** et atteignent des nombres extrêmement élevés = perturbation de l'acidification, pression infectieuse.
- En règle générale, **une seule souche** de phage **ne peut pas perturber** de manière significative l'acidification **d'une CMB**. Les souches infectées sont compensées par des souches résistantes.
- Pour garantir une inactivation des phages par **l'alcool**, l'application doit durer **plusieurs minutes**.
- Les cultures définies (principalement les mésophiles) sont particulièrement sensibles aux phages. La **rotation des cultures** et l'inoculation directe du lait de cuve peuvent solutionner le problème
- La résistance des cultures aux phages reste un thème de recherche important chez tous les producteurs de cultures.



**PRODUKTION & QUALITÄT PRODUCTION & QUALITÀ**

**Cultures liquides, sont-elles encore d'actualité?**

Dans l'industrie laitière, se passer des cultures d'ensemencement direct est désormais inconcevable. Cependant, de nombreux fabricants de fromage utilisent toujours des cultures liquides et en voici la raison.

**Acidification rapide**  
Malgré qu'il existe des cultures à ensemencement direct, de nombreuses fromageries artisanales ainsi que des fromageries industrielles utilisent aujourd'hui encore des cultures d'acidification liquides. Pour certaines sortes de fromages avec appellation d'origine protégée, l'utilisation de cultures d'exploitation est fixée dans le cahier des charges AOP. Une autre raison est leur bonne activité acidifiante. L'acidification se déclenche de manière instantanée alors que les cultures d'ensemencement direct lyophilisées ou congelées nécessitent un temps de réactivation.

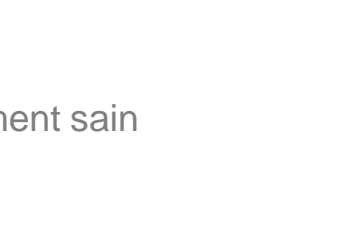
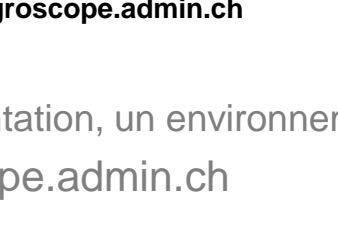
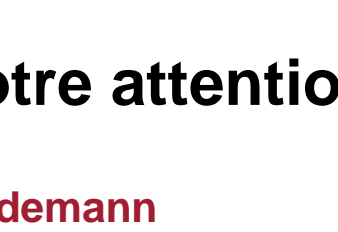
**Bonne résistance aux phages**  
En règle générale, les fabricants de cultures à ensemencement direct proposent plusieurs variantes pour chaque type de culture, qui se différencient par rapport à leur sensibilité à l'encontre des différentes souches de bactériophages. Etant donné qu'en général les cultures à ensemencement direct contiennent seulement une à trois souches par espèce de bactéries, elles sont particulièrement sensibles aux phages, raison pour laquelle une rotation des cultures est indispensable. Cependant, une rotation est également judicieuse lors de l'utili-

Ceci permet de réduire la durée de fabrication, ce qui représente un avantage considérable pour les fromageries qui produisent plusieurs charges par jour. Lors de la fabrication de fromages au lait cru, une acidification plus rapide contribue considérablement à augmenter la sécurité alimentaire et à diminuer le nombre de fermentations indésirables. Enfin, la fabrication des cultures d'exploitation est moins onéreuse.

En règle générale, les fabricants de cultures à ensemencement direct proposent plusieurs variantes pour chaque type de culture, qui se différencient par rapport à leur sensibilité à l'encontre des différentes souches de bactériophages. Etant donné qu'en général les cultures à ensemencement direct contiennent seulement une à trois souches par espèce de bactéries, elles sont particulièrement sensibles aux phages, raison pour laquelle une rotation des cultures est indispensable. Cependant, une rotation est également judicieuse lors de l'utili-

Toujours pas obsolètes: les cultures liquides de Liebefeld - Auch heute noch nicht von gestern: Flüssigkulturen aus dem Liebefeld.

30 | alimenta 3 | 2015



**Merci pour votre attention**

**John Haldemann**  
john.haldemann@agroscope.admin.ch

**Agroscope** une bonne alimentation, un environnement sain  
www.agroscope.admin.ch

