



**Croissance de *Listeria monocytogenes* et
Staphylococcus aureus dans
un fromage modèle Camembert réduit en NaCl ou
partiellement substitué en KCl**

Mémoire

Valérie Goulet-Beaulieu

Maîtrise en sciences et technologie des aliments

Maître ès science (M. Sc.)

Québec, Canada

© Valérie Goulet-Beaulieu, 2013

Résumé

Réduire le sodium dans les aliments transformés est une recommandation de Santé Canada. Or, le NaCl a un effet barrière reconnu sur la croissance des microorganismes. Des souches de *L. monocytogenes* et *S. aureus* ont été génotypées et étudiées selon leur tolérance au NaCl. Leur cinétique de croissance a été étudiée dans des caillés modèles Camembert soumis à différentes réductions en NaCl ou substitutions partielles par du KCl. La croissance de *L. monocytogenes* était légèrement supérieure à la surface de caillés réduits de 30 % de NaCl alors qu'au centre, l'utilisation du KCl permettait une diminution de sa croissance. Les conditions expérimentées ont permis la survie de *S. aureus* dans tous les caillés. Dans chacun des cas, il y a eu croissance inacceptable des pathogènes du point de vue de l'innocuité alimentaire : le risque relié à leur croissance dans un Camembert est donc peu influencé par les conditions salines.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières	v
Liste de tableaux.....	vii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations et sigles.....	xi
Remerciements	xv
Avant-propos	xvii
Introduction générale	1
Chapitre 1 – Revue de la littérature	3
1.1 Fabrication fromagère de type Camembert	5
1.1.1 Procédé de transformation	5
1.1.1.1 Techniques de salage	6
1.1.1.1.1 En saumure.....	7
1.1.1.1.2 À sec en surface	7
1.1.1.1.3 À sec dans la masse	7
1.1.1.2 Affinage : succession des microflores.....	8
1.2 Le sel	10
1.2.1 Réduction du sodium : mise en contexte.....	10
1.2.1.1 Effet du sodium sur la santé humaine.....	10
1.2.1.2 Description de la situation au monde et au Canada	11
1.2.1.3 Approche privilégiée par le gouvernement canadien.....	13
1.2.2 Rôles du NaCl dans le fromage.....	15
1.2.2.1 Contrôle de la croissance microbienne et des activités enzymatiques par l'ajustement de l'activité de l'eau	15
1.2.2.1.1 Définition du concept d'activité de l'eau	15
1.2.2.1.2 A_w et développement microbien dans le fromage	17
1.2.2.1.3 A_w et activité enzymatique.....	18
1.2.2.2 Effets sur les propriétés physico-chimiques.....	19
1.2.2.3 Effets sur les caractéristiques organoleptiques	19
1.2.2.4 Et l'ion chlorure.....	20
1.3 Bactéries pathogènes retrouvées dans le fromage	21
1.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
1.3.1.1 Caractéristiques générales	21
1.3.1.2 Facteur de virulence	22
1.3.1.3 Listériose.....	22
1.3.1.3.1 Épidémiologie.....	22
1.3.1.3.2 La pathologie.....	23
1.3.1.4 Croissance en situation de stress osmotique	23
1.3.1.4.1 Comportement de <i>L. monocytogenes</i> en milieu liquide	24
1.3.1.4.2 Comportement de <i>L. monocytogenes</i> dans les fromages.....	25
1.3.1.5 Classification de <i>L. monocytogenes</i> par sérotypage	27
1.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.3.2.1 Caractéristiques générales	28
1.3.2.2 Facteur de virulence	29
1.3.2.3 Intoxication à l'entérotoxine de <i>S. aureus</i>	30
1.3.2.3.1 Épidémiologie.....	30

1.3.2.3.2	La pathologie	31
1.3.2.4	Croissance de <i>S. aureus</i> et production d'entérotoxine en situation de stress osmotique	31
1.3.2.4.1	Comportement de <i>S. aureus</i> en milieu liquide	31
1.3.2.4.2	Comportement de <i>S. aureus</i> dans les fromages	32
1.3.2.5	Classification par MLST	34
1.4	Stratégies de réduction du NaCl dans les aliments	36
1.4.1	Sels de remplacement dans les fromages	37
1.4.1.1	KCl	37
1.4.1.1.1	Aspects législatifs et nutritionnels	37
1.4.1.1.2	KCl dans les fromages	38
1.5	Problématique, hypothèse et objectifs	40
Chapitre 2 – Croissance de <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. aureus</i> dans un fromage Camembert		
	modèle réduit en sodium ou partiellement substitué en KCl	41
2.1	Résumé	45
2.2	Abstract	46
2.3	Introduction	47
2.4	Materials et methods	49
2.4.1	Bacterial strains	49
2.4.2	Culture conditions	49
2.4.3	<i>L. monocytogenes</i> serotyping	51
2.4.4	<i>S. aureus</i> genotyping using MLST	51
2.4.5	Sodium chloride tolerance	52
2.4.6	SCMC production	52
2.4.7	Bacterial inoculum preparation	53
2.4.8	SCMC preparation and ripening conditions	53
2.4.9	SCMC sampling and analysis	54
2.4.10	Microbiological enumeration	54
2.4.11	Staphylococcal enterotoxin detection in SCMC inoculated with <i>S. aureus</i>	55
2.4.12	Experimental design and statistical analysis	55
2.5	Results and Discussion	56
2.5.1	Pathogenic strain characterization and selection	56
2.5.1.1	<i>L. monocytogenes</i> serotyping	56
2.5.1.2	Determination of the sodium chloride tolerance of <i>L. monocytogenes</i>	56
2.5.1.3	<i>S. aureus</i> MLST	57
2.5.1.4	Determination of the sodium chloride tolerance of <i>S. aureus</i>	58
2.5.1.5	Strains selected for study in SCMC	60
2.5.2	Analysis of SCMC ripening	60
2.5.2.1	pH measurement	60
2.5.2.2	Behavior of <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i> during SCMC ripening	61
2.5.2.2.1	NaCl net reduction	65
2.5.2.2.2	NaCl equimolar substitution by KCl	65
2.5.2.3	Conclusion	66
Chapitre 3 – Discussion générale, conclusion et perspectives		
3.1	Discussion générale	69
3.2	Conclusion et perspectives	73
Bibliographie		
75		
Annexe I : Charte de sérotypage <i>L. monocytogenes</i>		
88		

Liste de tableaux

Tableau 1.	Activité de l'eau de différentes variétés de fromages.	16
Tableau 2.	A_w minimale de croissance dans les aliments de certains microorganismes.	17
Tableau 3.	Sérotypes associés aux lignées génétiques de <i>L. monocytogenes</i> et nombre de cas relatifs. ...	28
Tableau 4.	Conditions environnementales permettant à <i>S. aureus</i> de produire une entérotoxine.	29
Tableau 5.	Les sept gènes conservés utilisés pour le MLST de <i>S. aureus</i>	34
Tableau 6.	Stratégies utilisées pour réduire le sodium dans les aliments.	36
Tableau 7.	<i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i> strains.	50
Tableau 8.	Saline conditions selected in soft cheese model curd.	54
Tableau 9.	<i>S. aureus</i> allelic profiles and sequence types.	58
Tableau 10.	Selected strains for study in SCMC.	60

Liste des figures

Figure 1.	Diminution de la pression artérielle (A) et de l'apport en sodium (B) de la population finlandaise entre 1972 et 2002	12
Figure 2.	Objectifs de la réduction de l'apport en sodium.....	13
Figure 3.	Principaux groupes d'aliments contribuant à l'apport en sodium.....	14
Figure 4.	Activité de l'eau minimale nécessaire à la croissance de <i>S. aureus</i> ajustée avec différents solutés	16
Figure 5.	Profil sensoriel d'un fromage Cheddar selon le ratio S/H utilisé	20
Figure 6.	Mécanisme de virulence de <i>L. monocytogenes</i>	22
Figure 7.	Principe du MLST	35
Figure 8.	Influence of NaCl concentration on the growth (OD _{650nm}) of <i>L. monocytogenes</i> in TSBYE after 24 h at 35°C.....	57
Figure 9.	Influence of NaCl concentration on the growth (OD _{650nm}) of <i>S. aureus</i> strains in TSBYE after 24 h at 35°C.....	59
Figure 10.	Evolution of pH at the surface and center of a SCMC under different saline conditions. The SCMC was inoculated with (a) <i>L. monocytogenes</i> LMA-1042, LMA-1044 and LMA-1045 (1:1:1) and (b) <i>S. aureus</i> LMA-1052, LMA-1053 and LMA-1063 (1:1:1) incubated over 33 days of ripening.....	61
Figure 11.	Growth of <i>L. monocytogenes</i> LMA-1042, LMA-1044 and LMA-1045 (1:1:1) at the surface and center of a SCMC under varied saline conditions over 33 days of ripening	63
Figure 12.	Survival of <i>S. aureus</i> LMA-1052, LMA-1053 and LMA-1063 (1:1:1) at the surface and center of a SCMC under varied saline conditions over 33 days of ripening	64

Liste des abréviations et sigles

ADN : acide désoxyribonucléique

AMT : apport maximal tolérable

ANOVA : *analysis of variance* / analyse de la variance

AS : apport suffisant

a_w : *water activity* / activité de l'eau

BHI : *brain heart infusion* / bouillon de culture cœur-cerveau

CFU : *colony forming unit* / unité formant une colonie

ES : entérotoxine staphylococcique

HR : humidité relative

KCl : *potassium chloride* / chlorure de potassium

LLO : listériolysine O

LMA : laboratoire de mycologie alimentaire

MLST : *multi-locus sequence typing*

NaCl : *sodium chloride* / chlorure de sodium

NSLAB : *non-starter lactic acid bacteria* / bactéries lactiques de la microflore secondaire

PCR : *polymerase chain reaction* / réaction de polymérase en chaîne

pb : paire de bases

pH : potentiel hydrogène

RH : *relative humidity* / humidité relative

SC : Santé Canada

S/H : sel-sur-humidité (ratio)

S/M : *salt-to-moisture* (ratio) / sel-sur-humidité (ratio)

spp. : *species* / espèces

SE : *staphylococcal enterotoxin* / entérotoxine staphylococcique

ST : séquence type / *sequence-type*

TIA : toxi-infection alimentaire

TSBYE : *tryptic soy broth with 0,6% yeast extract* / bouillon de soya tryptic avec 0,6 % d'extrait de levure

UFC : unité formant une colonie

La vie, c'est ce qui arrive quand on a d'autres projets.

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Steve Labrie, mon directeur de maîtrise, pour la confiance qu'il m'a accordée en me confiant ce projet. Faire partie de son **exceptionnelle** équipe de recherche a été un honneur et un plaisir quotidien. Steve, merci d'abord pour ta patience, aussi pour tes conseils, tes encouragements, ton soutien et ta générosité à tout moment lors de ce projet et particulièrement en fin de parcours. Je souhaite également remercier Monsieur Ismail Fliss pour sa contribution à l'élaboration du projet ainsi que Monsieur Paul Paquin pour avoir accepté de me partager son expertise par l'évaluation de ce mémoire.

Merci à l'appui financier de la Grappe de recherche laitière (Producteurs laitiers du Canada, Agriculture et agroalimentaire Canada, Commission canadienne du lait) pour la subvention du projet ainsi qu'au Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) pour m'avoir octroyé une bourse d'étude.

Un remerciement bien spécial aux professionnelles de recherche du laboratoire. À Brïte Pauchet, sans qui ce projet aurait tardé à démarrer : merci de m'avoir *coaché* dans cette planification laborieuse et de m'avoir supporté dans mon travail quotidien et jusqu'à la toute fin du projet. À Catherine Viel pour son expertise avisée, son écoute, ses conseils, sa grande disponibilité et aussi pour les nombreux fous rires !

Merci à mes collègues du 0308-0312 : Geneviève, Marie-Hélène, Maryline, Iraz, Rébecca et Ariane pour le temps passé ensemble et, à certaines d'entre vous, pour avoir répondu à mes multiples questions ; à Rima, pour ses sages paroles ; à Christophe et Benoit pour avoir partagé mon – très reclus – quotidien au P2 ; à Marie-Michelle pour le support technique et les nombreuses discussions « entre 2 portes » ; à Marilyne, Davy et Carl : merci d'avoir coulé toutes ces géluses pour moi ! Merci aussi à Mélanie M., Pascal L., Hélène F., Diane G., Diane R., Anne-Françoise A., Francis B. et Gaétan D.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents, Michel et Lorraine pour m'avoir soutenue inconditionnellement et avec une patience absolue pendant mes infinies réorientations académiques. Qui aurait cru que la fille de lettres deviendrait une scientifique... Merci à ma petite sœur Brigitte pour ses encouragements, son positivisme et sa douce folie. À mes plus chères amies, Hélène, Marie-Christine et Marie-Annick, merci, malgré mes absences, d'avoir été présentes, tout simplement. Je termine en remerciant celui qui m'a tenu la main tout au long du processus, mon amoureux Michel. Merci pour ta patience, ta tolérance et ta générosité. Merci d'avoir créé et partagé tous ces beaux moments pendant mes années d'études à la maîtrise.

Grâce à tous ces gens, la réalisation de ce projet de maîtrise a pu avoir lieu.

Grâce à eux, je peux aujourd'hui tourner une page.

Bonne lecture !

Avant-propos

Le très actuel sujet de ce projet de maîtrise vise à déterminer l'impact qu'aura la réduction du sodium sur l'innocuité du fromage de type Camembert. Ce mémoire est divisé en trois chapitres.

Le **premier** chapitre consiste en une revue de la littérature traitant de la fabrication fromagère de type Camembert, d'une mise en contexte de la réduction du sodium et des rôles de ce dernier dans le fromage, des caractéristiques de deux bactéries pathogènes retrouvées dans le fromage, soit *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'une dernière section sur les stratégies utilisées pour réduire le sodium dans les aliments, dont l'utilisation du KCl. Ce chapitre se termine par une présentation de la problématique, l'émission de l'hypothèse et l'établissement des objectifs de ce projet de recherche.

Le **second** chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique, dont je suis l'auteure principale. L'article est rédigé en langue anglaise et s'intitule « *Growth of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in a Low-Sodium or Partially Substituted by KCl Camembert Cheese Model* ». Il sera soumis à l'*International Journal of Food Microbiology*, un journal scientifique avec comité de révision par les pairs. Ce chapitre présente donc la méthodologie utilisée ainsi que les résultats obtenus, ce qui permet de répondre aux trois objectifs de mon projet de maîtrise.

L'implication de chacun des auteurs de l'article est la suivante :

Valérie Goulet-Beaulieu : candidate à la maîtrise, responsable de la planification et de la réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article.

Marilyne Touchette : participation à la planification et à la réalisation des expériences avec *L. monocytogenes* de l'objectif 1.

Brïte Pauchet : participation à la planification des expériences de l'objectif 2.

Ismail Fliss : Codirecteur de mémoire : élaboration du projet, correction et révision du manuscrit.

Steve Labrie : Directeur de mémoire : élaboration du projet, supervision et encadrement scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit.

Finalement, le **troisième** et dernier chapitre de ce mémoire inclut une discussion générale, suivie d'une conclusion résumant les principaux résultats de cette étude et présentant les perspectives d'avenir qui découlent de ma recherche.

Introduction générale

La production et la transformation laitière représentent 14,7 % de l'industrie alimentaire canadienne. Le lait de transformation représente 62 % de la production de l'industrie laitière canadienne, d'où sont issues, entre autres produits, plus de 1050 variétés de fromages canadiens, dont environ 235 pâtes molles. En 2011, la production canadienne des fromages à pâte molle, incluant le Camembert, représentait 18,43 % de la production fromagère totale (CCIL, 2012).

Le chlorure de sodium (NaCl), d'appellation commune *sel* ou *sel de table*, est fréquemment ajouté lors de la transformation de nombreux aliments, dont le fromage, faisant ainsi partie intégrante de l'alimentation des Canadiens. Au Canada, plus de 85 % des hommes et entre 63 et 83 % des femmes consomment du sodium de manière excessive (Santé Canada, 2012). Ce phénomène est directement lié au développement de l'hypertension artérielle ainsi qu'aux maladies qui lui sont associées, notamment le cancer de l'estomac et les maladies cardiovasculaires (Doyle et Glass, 2010 ; Karppanen et Mervaala, 2006) ; ces dernières étant la première cause de décès au Canada (ASPC, 2004).

En juin 2012, Santé Canada publiait le *Document d'orientation destiné à l'industrie alimentaire sur la réduction du sodium dans les aliments transformés* en complément à la *Stratégie de réduction du sodium pour le Canada*, publiée en 2010. Via ces documents, les experts recommandent, entre autres, une réduction de la teneur en sel des produits alimentaires transformés, dont le fromage (Fischer *et al.*, 2009 ; Santé Canada, 2010a). En 2011, le citoyen canadien a consommé en moyenne 12,29 kg de fromage, dont environ 61 % de fromages de spécialité, groupe qui inclut plusieurs types de fromages, dont le Camembert (CCIL, 2012).

Afin de répondre aux recommandations des experts, deux approches sont envisageables afin de limiter l'apport de NaCl via les fromages : restreindre l'ajout de NaCl lors de la production fromagère ou utiliser des substituts au NaCl.

L'impact qu'aura une réduction du sodium sur l'innocuité microbiologique du Camembert est toutefois inconnu. L'utilisation de sel est essentielle en transformation fromagère puisqu'il permet d'ajuster l'activité de l'eau. En théorie, réduire le NaCl augmente l'activité de l'eau et diminue conséquemment l'effet de la barrière protectrice contre les microorganismes pathogènes susceptibles de se développer dans le produit, tels *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, connus pour leurs caractéristiques d'halotolérance (Gandhi et Chikindas, 2007 ; Taormina, 2010). À ce jour, plusieurs études ont étudié la cinétique de croissance de ces pathogènes dans les fromages à pâte molle sans toutefois appliquer une réduction en

sodium (Back *et al.*, 1993 ; Genigeorgis *et al.*, 1991 ; Liu *et al.*, 2007 ; Meyrand *et al.*, 1998 ; Necidová *et al.*, 2009 ; Ramsaran *et al.*, 1998 ; Ryser et Marth, 1987b).

L'utilisation de sels de remplacement est une alternative envisageable afin de limiter l'ajout de NaCl dans les fromages. Jusqu'à présent, le chlorure de potassium (KCl) semble le sel présentant les caractéristiques de substitution les plus intéressantes dans les fromages considérant les impacts mineurs qu'il engendre des points de vue organoleptique et physico-chimique (Fitzgerald et Buckley, 1985 ; Grummer *et al.*, 2012 ; Lindsay *et al.*, 1982 ; Reddy et Marth, 1993). Au niveau de l'innocuité microbiologique, il a été démontré, en milieu de croissance liquide, que le NaCl et le KCl présentaient des effets similaires sur la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus* (Bidlas et Lambert, 2008 ; Bozianis *et al.*, 2007). Toutefois, aucune étude n'a été réalisée dans un Camembert dans le but de comparer l'action des deux sels sur la croissance de ces pathogènes.

Conséquemment, l'**objectif général** de ce mémoire est d'abord de **déterminer si, à l'égard de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*, l'innocuité actuelle du Camembert est compromise par des réductions en sodium ou par la substitution partielle du NaCl par du KCl**. Les informations obtenues permettront de mieux comprendre l'importance de la barrière du sel dans les fromages à pâte molle. De plus, les producteurs fromagers désirant initier une réduction du sodium dans leurs produits de type Camembert pourront le faire en étant informés des risques relatifs aux modifications des conditions salines.

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1 FABRICATION FROMAGÈRE DE TYPE CAMEMBERT

Le Camembert est un fromage à pâte molle, affiné en surface par une microflore fongique et possède une croûte fleurie (McSweeney *et al.*, 2004). Il peut être fabriqué à partir de lait cru ou pasteurisé, contient généralement entre 50 et 56 % d'humidité, entre 18 et 30 % de matières grasses et entre 17 et 21 % de protéines (Genigeorgis *et al.*, 1991 ; Gillis, 2004 ; Sutherland, 2002). Le pH en fin d'affinage du Camembert atteint environ 7,4 en surface et 6,9 au centre (Genigeorgis *et al.*, 1991).

1.1.1 Procédé de transformation

La transformation du lait en fromage permet de concentrer les protéines, les matières grasses, les minéraux et certaines vitamines contenus dans ce lait. La fabrication se déroule principalement en trois étapes, soit la **coagulation**, l'**égouttage** et l'**affinage**, lesquelles peuvent présenter certaines différences selon la nature du fromage fabriqué (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). Chacune de ces étapes sera brièvement abordée en lien avec la fabrication du fromage Camembert.

La **coagulation** consiste en la formation d'un gel à la suite de la dénaturation des micelles de caséines du lait (Sousa, 2003). L'organisation structurale de la protéine peut, en effet, être modifiée par une voie acide, enzymatique ou mixte. D'abord, la coagulation acide résulte de l'action de ferments lactiques mésophiles, habituellement un mélange de souches de *Lactococcus* et/ou *Lactobacillus* et/ou *Leuconostoc* et/ou *Streptococcus* (Champagne, 1998 ; Spinnler et Gripon, 2004). Ces ferments métabolisent le lactose en acide lactique, ce qui provoque l'abaissement du pH. Le phosphate de calcium colloïdal, qui assure la stabilité de la micelle, est alors solubilisé (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). La coagulation enzymatique est, quant à elle, provoquée lors de l'ajout au lait de présure, dont la chymosine est l'enzyme principale. Cette dernière est une endopeptidase qui, par une réaction d'hydrolyse spécifique ciblant la caséine κ , permet la gélification du lait (Farkye, 1999). Dans le caillé Camembert, la coagulation est de type mixte (Codex Alimentarius, 2010), c'est-à-dire qu'elle fait appel à l'action conjuguée de ces deux types de coagulation (Cholet, 2006).

L'**égouttage** est défini par un phénomène de synérèse, permettant l'expulsion du lactosérum à la suite de la contraction du gel (Sousa, 2003). Lors de cette étape, selon le type de fromage fabriqué, diverses techniques sont utilisées pour favoriser l'expulsion du lactosérum. Dans le cas du Camembert, des traitements mécaniques tels que le découpage, le brassage, le moulage et les retournements sont utilisés pour permettre l'élimination du lactosérum (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). Puisque l'humidité de ce type de fromage est

élevée, au maximum 56 % (Ministère de la justice, 2012), l'égouttage du caillé Camembert est très modéré comparé à d'autres variétés de fromages.

Une des étapes intermédiaires de la fabrication fromagère implique le **salage** du caillé, lequel est habituellement effectué à la fin de la période d'égouttage, permettant de compléter cette étape en augmentant la pression osmotique dans la matrice (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). Considérant l'importance du sel dans le présent projet, les techniques de salage et les rôles du sel sont respectivement traités aux sections 1.1.1.1 et 1.2.2). La concentration en sel varie en fonction du type de fromage fabriqué. Plusieurs facteurs permettent d'établir la teneur en sel d'un fromage, notamment le type de pâte, les paramètres d'affinage (humidité relative, température, composition de l'atmosphère) ainsi que les microorganismes utilisés pour sa fabrication. Bien qu'il n'existe pas de normes quant à la teneur en NaCl dans le Camembert, un pourcentage final entre 1,5 et 2,5 % est généralement souhaité (Ryser et Marth, 1987b ; Sousa, 2003).

L'**affinage** est la dernière étape de la transformation fromagère. Sa durée varie de quelques jours à quelques années selon le type de fromage et ce, afin d'obtenir les qualités texturales et organoleptiques désirées. Ces dernières sont obtenues par une série de réactions biochimiques réalisées par la microflore microbienne et ses enzymes, qui métabolisent différents substrats glucidiques, lipidiques et protéiques, générant ainsi divers produits, qui eux aussi peuvent à leur tour être dégradés par des systèmes enzymatiques secondaires (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). La période d'affinage du Camembert est généralement courte, soit entre 12 et 45 jours et se déroule à une température variant habituellement entre 12 et 14 °C. Les fromages sont généralement entreposés dans un lieu d'affinage permettant de contrôler l'humidité relative entre 85 et 95 % (Cholet, 2006). La succession des microflores lors de l'affinage est détaillée à la section 1.1.1.2.

1.1.1.1 Techniques de salage

L'action du sel dans un fromage peut être étudiée selon le **ratio sel/humidité** (S/H ; en anglais *S/M : salt-to-moisture*) puisque ces deux paramètres sont intrinsèquement liés. Ce ratio représente la concentration en sel dans le fromage par rapport à sa teneur en eau. Le ratio S/H d'un Camembert varie généralement entre 2,7 et 4,8 (Gillis, 2004 ; Guinee et Fox, 2004 ; Sutherland, 2002).

En technologie fromagère, il existe trois **méthodes de salage**, soit l'immersion du fromage dans une saumure, le salage à sec en surface et à sec dans la masse. Quelle que soit celle utilisée, le processus se déroule en toujours en deux phases ; d'abord, l'absorption du sel en surface et ensuite, sa diffusion progressive vers le centre du fromage (Gillis, 2004 ; Sutherland, 2002).

1.1.1.1.1 En saumure

Le Camembert est traditionnellement salé par saumurage (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004) tout comme les fromages Edam, Gouda, Provolone et Suisse (Cruz *et al.*, 2011). Cette technique implique que le caillé soit immergé pendant un certain temps dans la saumure, c'est-à-dire une solution saturée en NaCl. Par exemple, Leclercq-Perlat *et al.* (2004) utilisent une saumure saturée à 33 % pendant 25 minutes, bien que la durée du saumurage puisse aller jusqu'à 90 minutes dans certains cas (Gillis, 2004). La différence de concentration en NaCl entre la saumure et la phase aqueuse du fromage induit la diffusion du NaCl dans la matrice fromagère et conséquemment, l'expulsion de la phase aqueuse. La concentration en NaCl, la température de la saumure, la durée du saumurage, la forme et la composition du fromage sont des paramètres clés à contrôler lors du saumurage (Gillis, 2004).

1.1.1.1.2 À sec en surface

L'apport de sel à la surface du fromage peut être réalisé par frottage, par saupoudrage ou par roulage des fromages dans un lit de sel (Gillis, 2004). Cette méthode est entre autres utilisée pour le fromage Bleu et pour certaines fabrications de fromages à croûte fleurie dont le Camembert (Cruz *et al.*, 2011 ; Guizani *et al.*, 2002). Un désavantage de cette technique est le manque d'uniformité du salage ; en effet, l'homogénéisation de la teneur en sel a été atteinte après 23 jours dans un Camembert salé de cette manière (Guizani *et al.*, 2002). Le mécanisme d'absorption du sel à la surface est plus lent que dans le cas du saumurage, car le sel doit d'abord s'hydrater et se dissoudre à la surface pour ensuite diffuser vers l'intérieur (Gillis, 2004). La granulométrie du sel utilisé est particulièrement importante. Dans le cas d'une pâte molle, il est recommandé qu'elle soit entre 200 et 630 microns (Gillis, 2004).

1.1.1.1.3 À sec dans la masse

Le salage à sec dans la masse consiste à mélanger le sel au fromage préalablement découpé, en grains par exemple, avant le pressage ou la mise en moule. Cette technique permet une diffusion rapide du sel dans la masse et requiert que le rapport surface/volume soit très bien contrôlé afin d'optimiser l'établissement du film de sel autour de chaque grain de fromage (Cruz *et al.*, 2011 ; Gillis, 2004). Les fromages Cheddar et Stilton sont salés de cette manière (Cruz *et al.*, 2011). Cette technique n'est cependant pas utilisée pour le Camembert.

1.1.1.2 Affinage : succession des microflores

L'affinage du Camembert est complexe puisqu'elle résulte de l'interaction entre les microflores bactériennes et fongiques, dont la succession est déterminée par des changements chimiques de la matrice fromagère. Les principaux ferments utilisés pour l'affinage du Camembert sont *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* et *Kluyveromyces lactis*. Ils peuvent être inoculés au lait en début de fabrication ou bien après le démoulage, par vaporisation à la surface du fromage (D'amico *et al.*, 2008 ; Spinnler et Gripon, 2004).

L'ajout de bactéries lactiques lors de la fabrication permet une diminution du pH (section 1.1.1) ; ce qui favorise la microflore acidophile comme les levures et les moisissures (Spinnler et Gripon, 2004). À partir du 4^{ème} jour d'affinage, *P. camemberti* et *G. candidum* entrent dans leur phase exponentielle de croissance jusqu'au jour 18 et dominent rapidement l'écosystème alors que *K. lactis* est présent, mais à de plus faibles concentrations (Lessard *et al.*, 2012). L'évolution de la lipolyse et de la protéolyse dans le caillé est reliée, entre autres, à la croissance de ces espèces.

D'abord, le principal agent **lipolytique** du Camembert est *P. camemberti*, lequel synthétise deux lipases alcalines extracellulaires. *G. candidum* synthétise également deux lipases qui ont chacune une action sélective (Baillargeon *et al.*, 1989). La dégradation prononcée des lipides se réalise sous la croûte du fromage où ces enzymes hydrolysent les triglycérides, générant ainsi des diglycérides, des monoglycérides et des acides gras libres (Spinnler et Gripon, 2004).

En ce qui concerne l'activité **protéolytique**, *G. candidum* synthétise des protéinases intra- et extracellulaires, mais son activité protéolytique est considérée comme étant faible comparée à celle de *P. camemberti*, qui produit une grande quantité d'endo- et d'exopeptidases extracellulaires (Nichol, 1999 ; Spinnler et Gripon, 2004). Plus précisément, *P. camemberti* possède des métalloprotéinases et des aspartates protéinases, lesquelles sont en concentration maximale vers le 15^{ème} jour d'affinage et diminuent lentement par la suite (Spinnler et Gripon, 2004). Cette moisissure est donc responsable d'une grande production d'acides aminés dans le fromage (Spinnler et Gripon, 2004). La protéolyse effectuée par *K. lactis* est plus lente et son effet est moins marqué. L'ammoniac généré à la suite des réactions protéolytiques ainsi que le catabolisme du lactate de ces ferments permettent l'alcalinisation en surface du caillé (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004 ; Lessard *et al.*, 2012 ; Spinnler et Gripon, 2004). Un gradient de pH est alors observé dans le fromage, la surface étant près de la neutralité après quelques jours et le centre demeurant acide (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Ce phénomène favorise la migration des minéraux (calcium et phosphore inorganique) vers l'extérieur du fromage, modifie les propriétés rhéologiques de la pâte et, entre les jours 15 et 20, permet l'établissement des microflores secondaires acido-sensibles en surface (Spinnler et Gripon, 2004). Ces dernières contribuent

aussi aux activités protéolytiques et lipolytiques dans le fromage via la production extracellulaire de protéases et de lipases (Spinnler et Gripon, 2004). La microflore secondaire peut notamment être composée de *Micrococcus* spp., de *Staphylococcus* spp., d'*Acinetobacter* spp., de *Corynebacterium* spp. et de NSLAB (*non-starter lactic acid bacteria* ; en français : bactéries lactiques de la microflore secondaire) (Addis *et al.*, 2001 ; Spinnler et Gripon, 2004).

1.2 LE SEL

Le chlorure de sodium (NaCl), d'appellation commune *sel* ou *sel de table*, est présent dans plusieurs aliments transformés et, par conséquent, dans l'alimentation des Canadiens. Le sel de table est considéré comme étant du « chlorure de sodium cristallisé extrait de sources naturelles, avec l'addition obligatoire d'iode » (Cruz *et al.*, 2011).

Le sel est ajouté dans plusieurs aliments comme moyen de contrôle de l'activité de l'eau (section 1.2.2.1), ce qui permet la conservation des aliments, mais aussi le contrôle des propriétés physico-chimiques de l'aliment (section 1.2.2.2). Le sel permet également de modifier le goût des aliments (section 1.2.2.3). À titre d'exemple, le fromage contient entre 0,15 et 7,0 % de NaCl en fonction des variétés (Doyle et Glass, 2010 ; Guinee et Fox, 2004 ; Guinee et O'Kennedy, 2007).

L'industrialisation de la transformation alimentaire a quelque peu modifié l'incorporation du sodium dans les aliments et l'utilisation traditionnelle du sel. Autrefois perçue positive, puisque garante d'une innocuité microbiologique, l'addition de sodium aux aliments, que ce soit du NaCl ou d'autres additifs alimentaires tels que le propionate de sodium, l'acétate de sodium, le sorbate de sodium (Sofos, 1984), est aujourd'hui perçue comme étant plutôt négative étant donné les effets néfastes connus liés à sa surconsommation.

1.2.1 Réduction du sodium : mise en contexte

1.2.1.1 Effet du sodium sur la santé humaine

La consommation de sodium est essentielle pour l'humain. En effet, cet élément nutritif contribue à la régulation des pressions osmotique et sanguine, au transport d'eau intracellulaire, à la transmission d'impulsions nerveuses, à la régulation du volume du plasma sanguin et au transport actif de molécules à travers les membranes cellulaires (Cruz *et al.*, 2011 ; Doyle et Glass, 2010 ; Hypertension Canada, 2010).

Le sel est absorbé à 98 % par l'intestin alors que l'excès, après avoir traversé les reins, est généralement excrété via l'urine ou la transpiration. La régulation homéostatique du sodium peut toutefois être entravée par différentes conditions médicales ou ne plus suffire si l'apport en sodium est trop important. À ce sujet, il est connu que si l'excrétion du sodium est insuffisante, la pression artérielle augmente et peut causer des lésions à différents organes (Doyle et Glass, 2010 ; Hypertension Canada, 2010 ; Karppanen et Mervaala, 2006).

La consommation excessive de sodium représente donc un facteur de risque pour initier ou accentuer le phénomène d'hypertension artérielle ainsi qu'aux maladies qui lui sont associées, telles le cancer de l'estomac, l'asthme, le diabète, les maladies du foie et celles cardiovasculaires ; ces dernières étant la première cause de décès au Canada (ASPC, 2004 ; Cruz *et al.*, 2011 ; Doyle et Glass, 2010 ; He et MacGregor, 2002 ; Karppanen et Mervaala, 2006). La consommation excessive de sodium peut aussi affecter la rétention du calcium et la densité des os, car les métabolismes et le transport intercellulaire du sodium et du calcium sont reliés (Doyle et Glass, 2010). Les effets d'une médication contre l'hypertension peuvent de même être atténués par une absorption excessive de sodium (Whelton *et al.*, 2012). De plus, l'hypertension artérielle est le premier facteur de risque au monde quant à la mortalité évitable (Santé Canada, 2010a), laquelle « désigne les décès prématurés (chez les personnes de moins de 75 ans) qui ne devraient pas se produire avec la prestation de soins de santé opportuns et efficaces ou la mise en place de pratiques, de programmes et de politiques de santé publique appropriés » (ICIS, 2012).

1.2.1.2 Description de la situation au monde et au Canada

Partout à travers le monde, des initiatives sont établies pour réduire la consommation du sodium des différentes populations. Depuis 2007, l'Organisation mondiale de la santé (OMS ; en anglais *WHO* : *World Health Organization*) soutient le développement de stratégies nationales de réduction du sodium (WHO, 2007). En 2005, l'*Institute of Medicine* (IOM) (2005) suggérait un apport suffisant¹ (AS) de sodium de 1500 mg/jour alors que le besoin physiologique réel d'une personne est de 230 mg/jour (WHO, 2007). Cependant, cet organisme (IOM, 2013) a récemment analysé 38 articles relatant des travaux effectués afin de comprendre le lien entre l'apport en sodium et les impacts sur la santé humaine. Bien que plusieurs de ces études soient très variables au niveau de la qualité de la méthodologie ; lorsqu'elles sont considérées dans leur ensemble, elles démontrent une relation positive entre un apport élevé en sodium et le risque de maladies cardiovasculaires. Une autre conclusion importante de l'IOM (2013) est que ces études sont insuffisantes pour démontrer que la diminution de l'apport en sodium en deçà de 2300 mg soit réellement efficace pour réduire les risques de maladies cardiovasculaires. Finalement, en 2013, l'OMS a suggéré une cible quotidienne de moins de 5 g NaCl (2000 mg Na) par personne et un apport maximal de 2 g NaCl par jour pour un enfant (WHO, 2013). La plupart des pays engagés dans une initiative de réduction du sodium recommandent une consommation quotidienne égale ou inférieure à 2400 mg Na (Dötsch *et al.*, 2009).

¹ AS : l'apport recommandé que l'on suppose satisfaire ou excéder les besoins de presque toutes les personnes (Santé Canada, 2010a)

En 2011, Webster *et al.* ont dénombré 32 pays mobilisés dans une initiative de réduction du sodium, dont le Canada. La Finlande et le Royaume-Uni, étant engagés dans le processus depuis un certain temps, ont déjà pu réaliser un suivi des progrès obtenus à la suite de leur initiative.

Avant-gardiste, la **Finlande** a pris cette initiative depuis 1979 et avait réussi, en 2002, à diminuer l'apport en sodium de ses habitants d'environ 33 % (5000 à 3300 mg/jour) (Figure 1). En 2007, l'apport en sodium des Finlandais avait diminué de 40 % (WHO, 2013). Ainsi, 34 ans après l'implantation de sa stratégie de réduction en sodium, le pays a réduit par la même occasion de 75 % la mortalité causée par des accidents vasculaires cérébraux et des maladies cardiaques (Santé Canada, 2010a). Actuellement, les efforts de ce pays sont principalement axés vers la réduction du sodium de 20 à 25 % dans les pains (WHO, 2013).

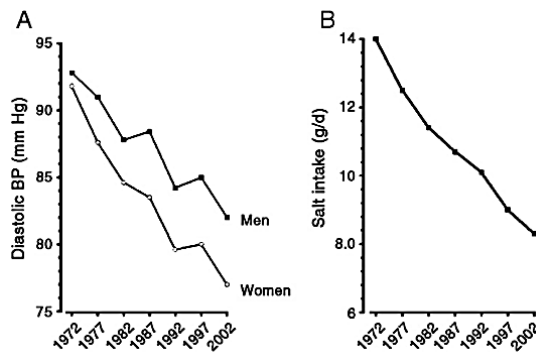


Figure 1. Diminution de la pression artérielle (A) et de l'apport en sodium (B) de la population finlandaise entre 1972 et 2002 (figure adaptée de Karppanen et Mervaala (2006)).

En 2003, le **Royaume-Uni** visait une réduction de la consommation de sodium de 3800 à 2400 mg/jour par personne avant 2010, soit une diminution de 36 % en sept ans. En 2008, une étude a révélé que la consommation de sodium des Anglais avait chuté de 10 % (3440 mg) en sept ans (WHO, 2013). En 2009, le gouvernement anglais a révisé les cibles afin d'en suggérer des nouvelles à atteindre pour 2012 (FSA, 2009; WHO, 2013). Une seconde étude a été réalisée en 2011 afin de réévaluer la consommation en sodium chez les personnes entre 19 et 64 ans. Il a été démontré que l'apport quotidien avait diminué de 300 mg chez les hommes et de 900 mg chez les femmes, mais que cette diminution n'était toutefois pas significative par rapport à celle de 2008 (Sadler *et al.*, 2011).

Au **Canada**, la consommation moyenne de sodium par habitant est élevée, soit de 3098 mg/jour, cette moyenne étant basée sur tous les groupes d'âge et de sexes (Fischer *et al.*, 2009). Le groupe le plus problématique étant les hommes âgés entre 9 et 18 ans, lesquels ont un apport moyen en sodium dépassant

de 97 % l'apport maximal tolérable² (AMT) (Barr, 2010). En 2010, le gouvernement canadien recommandait effectivement un AMT de 2300 mg Na/jour (5,75 g NaCl/jour), ce qui correspond à une réduction de 25 %, un objectif intérimaire fixé pour 2016 (Figure 2). L'objectif ultime étant qu'un maximum de personnes possible, soit plus de 95 % de la population, atteigne un apport en sodium quotidien moyen inférieur à cet AMT et se rapproche autant que possible de l'AS (Santé Canada, 2010a).

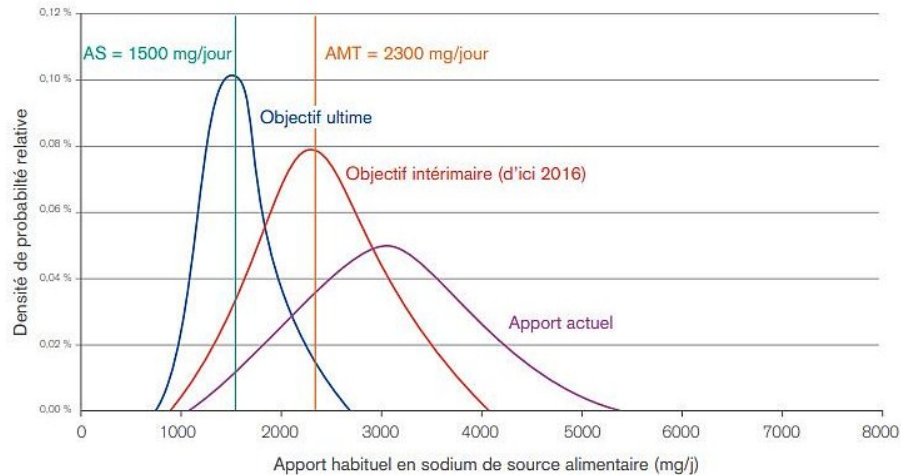


Figure 2. Objectifs de la réduction de l'apport en sodium (figure intégralement tirée de Santé Canada (2010a)). L'AS et l'AMT sont présentés en relation avec l'apport actuel en sodium ainsi que les différents objectifs de réduction du sodium et les échéanciers proposés par Santé Canada.

1.2.1.3 Approche privilégiée par le gouvernement canadien

En 2007, le gouvernement canadien a réuni plusieurs experts et a formé le *Groupe de travail sur le sodium*, lequel avait pour objectif « [d'] élaborer une stratégie sur la santé de la population visant à réduire l'apport en sodium des Canadiens et des Canadiennes » (Santé Canada, 2010a).

Au mois de juillet 2010, ce groupe publiait *La stratégie de réduction du sodium pour le Canada - Recommandations du Groupe de travail sur le sodium*, un document qui dresse, entre autres, les sources majeures de sodium dans l'alimentation des Canadiens. Ainsi, 77 % de l'apport quotidien en sodium provient des aliments transformés, tandis que 6 % du sel est ajouté à table, 5 % l'est pendant la préparation des repas et 12 % est présent naturellement dans les aliments (Santé Canada, 2010a). Les six principaux groupes d'aliments contribuant à près de 50 % de l'apport quotidien en sodium sont 1) les pains, pains éclair et autres produits apparentés, 2) les viandes transformées, 3) les plats à base de légumes, jus de tomate et de

² AMT : « apport quotidien moyen le plus élevé ne comportant pas de risque d'entraîner des effets indésirables sur la santé et représentant un apport qui ne devrait pas être dépassé » (Santé Canada, 2010a).

légumes, 4) les soupes, 5) les plats à base de pâtes et 6) le fromage (Figure 3). Le fromage représente 5,38 % de la consommation quotidienne de sodium ingéré par un Canadien (Fischer *et al.*, 2009 ; Santé Canada, 2010a). Le *Groupe de travail sur le sodium* recommande, entre autres, une réduction de la teneur en sodium des produits alimentaires transformés étant donné leur grande contribution dans l'apport quotidien en sodium des Canadiens.

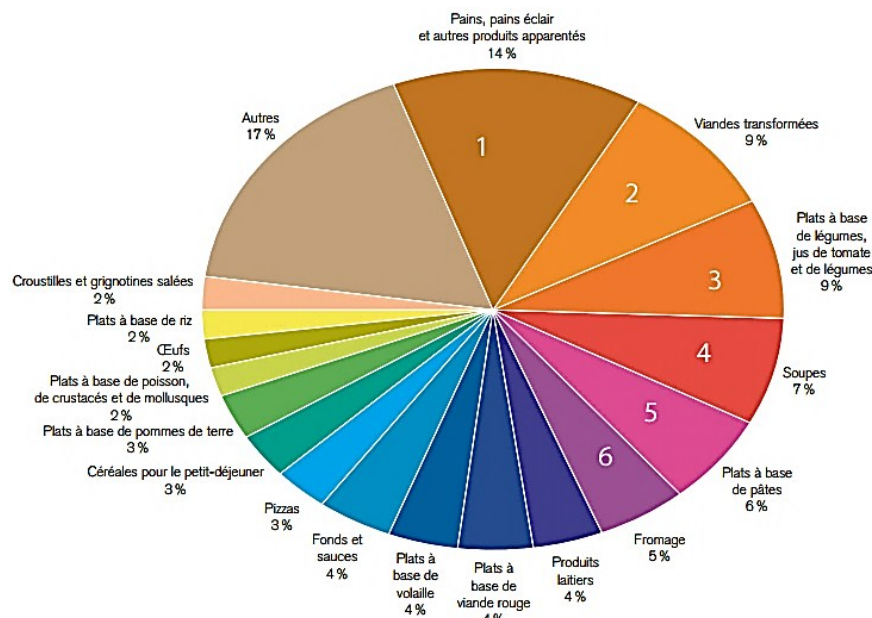


Figure 3. Principaux groupes d'aliments contribuant à l'apport en sodium (figure adaptée de Santé Canada (2010a)).

Inspirée par les cibles proposées par la *Food Standards Agency* au Royaume-Uni, Santé Canada (SC), appuyé par le CCEA (comité consultatif d'experts sur les aliments), a proposé des cibles de réduction du sodium dans les aliments transformés. En juin 2012, SC a publié le *Document d'orientation destiné à l'industrie alimentaire sur la réduction du sodium dans les aliments transformés*, à l'intérieur duquel des réductions de la teneur en sodium de certaines d'aliments, notamment les produits laitiers et les fromages, ont été suggérées. Les catégories de produits visés par la réduction ont été établies en fonction de données produites par A. C. Nielsen sur le volume des ventes et, considérant l'omniprésence du sodium dans les aliments, visent à inclure « le plus grand nombre possible de catégories d'aliments transformés » (Santé Canada, 2012). La démarche proposée à l'industrie alimentaire est volontaire. Il est, conseillé aux industriels de réaliser une réduction du sodium graduelle en trois étapes dans le but d'atteindre la cible de 30% de réduction, au maximum le 31 décembre 2016.

L'atteinte de l'objectif de 2016 ne peut toutefois être supportée qu'uniquement par la réduction du sodium dans les aliments transformés. SC préconise une approche multi-facettes, notamment en ayant émis des recommandations relatives non seulement à l'approvisionnement alimentaire, mais aussi à la sensibilisation et l'éducation de la population ainsi qu'au secteur de la recherche (Santé Canada, 2010a, 2012). Un processus législatif permettant l'accélération de l'approbation de substituts de sel a aussi été mis en place afin de favoriser la réduction du sodium (AAC, 2012).

Il a été estimé qu'au Canada, une réduction de 42 % du sodium (soit, à peu de chose près, l'atteinte de l'AS recommandé) représenterait, par an, une diminution de 30 % de la prévalence de l'hypertension artérielle et de 13 % des cas de maladies cardiovasculaires (Santé Canada, 2010a, 2012).

1.2.2 Rôles du NaCl dans le fromage

Le NaCl exerce trois rôles principaux dans le fromage soit le contrôle de la croissance microbienne et des activités enzymatiques par l'ajustement de l'activité de l'eau (a_w), le contrôle des propriétés physico-chimiques et l'effet sur les qualités organoleptiques. Chacun de ces rôles sera expliqué en détail dans les sous-sections suivantes.

1.2.2.1 Contrôle de la croissance microbienne et des activités enzymatiques par l'ajustement de l'activité de l'eau

L'ajout de NaCl dans les aliments réduit l' a_w , laquelle a un rôle primordial dans le contrôle de l'activité des différentes microflores et des enzymes présentes dans un écosystème fromager (Doyle et Glass, 2010; Guinee et Fox, 2004).

1.2.2.1.1 Définition du concept d'activité de l'eau

L' a_w est définie comme étant la proportion d'eau disponible pour les réactions biologiques dans une matrice alimentaire à une température donnée. À température constante, il s'agit du rapport p/p_0 où p représente la pression de vapeur dans un système quelconque déterminé par la présence d'un soluté et p_0 la pression de vapeur de l'eau pure (Gillis, 2004 ; St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

Divers solutés peuvent être utilisés pour l'ajustement de l' a_w , notamment le NaCl ou autres sels, différents sucres simples ou complexes, le glycérol et autres (Miller, 1992). La nature du soluté est importante car son effet bactériostatique ou bactéricide dépend de sa capacité à traverser la membrane cellulaire bactérienne (Chirife, 1994). Cette capacité peut notamment être modulée par la grosseur des molécules et leur potentiel

d'oxydoréduction. À titre d'exemple, la figure 4 présente l' a_w minimale de croissance de *S. aureus* en fonction des différents solutés utilisés. Une inhibition de la croissance de ce pathogène est observée à partir d'une a_w de 0,98 lorsque le soluté est de l'éthanol alors que l'inhibition survient à une a_w de 0,87 dans le cas où du NaCl est utilisé pour ajuster l' a_w . De plus, le tableau 1 présente l' a_w de quelques fromages, celle-ci variant entre 0,99 et 0,91 en fonction de la variété.

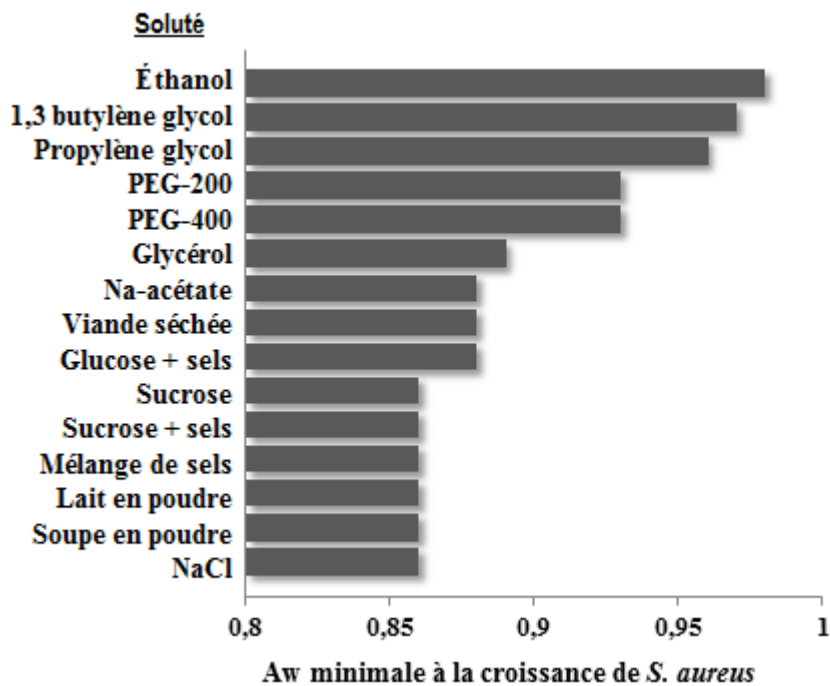


Figure 4. Activité de l'eau minimale nécessaire à la croissance de *S. aureus* ajustée avec différents solutés (figure adaptée de Chirife (1994)).

Tableau 1. Activité de l'eau de différentes variétés de fromages.

Fromages	a_w
Cottage	0,99
Camembert	0,96 à 0,98
Emmental	0,97
Gouda	0,95
Mozzarella	0,94
Parmesan	0,92
Roquefort	0,91

Adapté de Gillis (2004), Guinee et Fox (2004) et Larpent (2004).

1.2.2.1.2 A_w et développement microbien dans le fromage

L'addition de NaCl lors de la production fromagère favorise le phénomène de synérèse (section 1.1.1), ce qui permet d'obtenir l' a_w et l'humidité finales recherchées, qui seront garantes du développement microbien et de l'innocuité microbiologique du fromage (Guinee et Fox, 2004 ; Johnson *et al.*, 2009). L' a_w à laquelle un microorganisme est en mesure de croître est un paramètre propre à chaque espèce, voire à chaque souche (Gillis, 2004) et est aussi différente en fonction de la matrice alimentaire. En effet, chaque aliment est composé de « barrières multiples » (en anglais : *hurdles*) qui, leurs effets combinés, protègent l'aliment contre la croissance microbienne indésirable ou pathogène. Selon l'aliment et son procédé de transformation, ces barrières peuvent inclure la température de chauffage, la température d'entreposage, l' a_w , le pH, le potentiel d'oxydoréduction et/ou l'utilisation d'agents de conservation (Leistner et Gorris, 1995). Dans le fromage, les barrières les plus importantes sont le pH, l' a_w et la température d'entreposage/d'affinage. À titre d'exemple, les a_w minimales de croissance de quelques microorganismes sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. A_w minimale de croissance dans les aliments de certains microorganismes.

Microorganismes	a_w
Bactéries	
<i>Lactococcus lactis</i>	0,96
<i>Shigella</i> spp.	0,96
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Clostridium botulinum</i>	0,94
<i>Salmonella</i> spp.	0,94
<i>L. monocytogenes</i>	0,92
<i>S. aureus</i>	0,86
<i>S. aureus</i> – production de toxine	0,90
Levures et moisissures	
<i>Geotrichum candidum</i>	0,95 à 0,97
<i>Penicillium camemberti</i>	0,86

Adapté de Doyle et Glass (2010), Gillis (2004) et Guinee et Fox (2004)

En deçà de l' a_w minimale, la bactérie subit un choc osmotique qui provoque une plasmolyse, c'est-à-dire le rétrécissement du volume cytoplasmique. Cela peut causer la mort cellulaire considérant qu'il y a inhibition à la fois de l'apport en nutriments et de la réplication de l'ADN (Csonka, 1989). Les conséquences liées à l'augmentation de l' a_w dans le milieu sont généralement similaires pour l'ensemble des bactéries : diminution de leur phase de latence, augmentation de leur vitesse de croissance et de leur population maximale. L'ajustement de l' a_w permet donc une action sélective et inhibitrice sur la microflore du système et constitue un moyen de contrôle lors de l'affinage (Gillis, 2004 ; St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

D'abord, le métabolisme de la **microflore primaire**, constituée des ferments lactiques ajoutés au début du procédé de transformation (section 1.1.1), est contrôlé par l'ajout de sel en fin de fabrication fromagère. En effet, lorsque le pH désiré est atteint dans le caillé, un dosage adéquat de la quantité de NaCl ajoutée permet le contrôle de la glycolyse primaire des ferments lactiques, c'est-à-dire la transformation du lactose en acide lactique (Guinee et Fox, 2004 ; Johnson *et al.*, 2009). La chute du pH inhibe donc la microflore primaire, laissant ainsi place à la croissance d'une **microflore secondaire** (section 1.1.1.2) qui prend alors la relève du procédé fermentaire. Cette seconde microflore est généralement constituée de bactéries lactiques « contaminantes » (mais non pathogènes) qui peuvent avoir subsisté à la pasteurisation du lait ou encore, provenir de l'environnement (fromager, air, outils utilisés) (Broadbent *et al.*, 2011 ; Guinee et Fox, 2004). Bien que généralement plus tolérante au NaCl que la microflore primaire, la croissance de la microflore secondaire est aussi contrôlée par l' a_w , laquelle, en restreignant ou en favorisant certaines espèces, influence le taux de glycolyse secondaire. Conséquemment, le pH final obtenu à la fin de la période d'affinage peut aussi être modulé par la quantité de sel ajoutée (Guinee et Fox, 2004 ; Johnson *et al.*, 2009).

La présence de sel dans la phase aqueuse du fromage permet en plus le contrôle de la croissance des **microorganismes pathogènes**, l'effet pouvant être bactéricide ou bactériostatique, selon la concentration et la nature du pathogène présent (Doyle et Glass, 2010). L' a_w minimale de croissance de certaines espèces pathogènes est présentée au tableau 2 et montre que *S. aureus* et *L. monocytogenes* sont parmi les plus halotolérants. La croissance des **ferments d'affinage** est aussi influencée par l' a_w minimale. La moisissure *P. camemberti* est peu sensible à la présence de NaCl alors que la levure *G. candidum* l'est davantage et de manière souche-dépendante (Spinnler et Gripon, 2004).

1.2.2.1.3 A_w et activité enzymatique

L'ajustement de l' a_w , via l'ajout de NaCl, permet de moduler la nature et la vitesse des différentes réactions enzymatiques en cours d'affinage (Johnson *et al.*, 2009). La lipolyse et la protéolyse sont essentielles pour l'obtention de la texture et de la production des composés aromatiques désirés dans le fromage (Gillis, 2004 ; Sutherland, 2002).

L'action des **enzymes coagulantes**, telles la chymosine et la pepsine, sur l'hydrolyse des caséines est stimulée généralement par une teneur optimale en NaCl de 6 % (Guinee et Fox, 2004). L'hydrolyse de la caséine α_{s1} , bien que limitée, peut être réalisée jusqu'à un taux de 20 % de NaCl (Guinee et Fox, 2004). L'augmentation de la teneur en NaCl, et donc la réduction de l' a_w , diminue l'hydrolyse de la caséine β , qui est complètement inhibée à partir de 5 % de NaCl (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002). Une modification de l' a_w peut aussi réduire la protéolyse primaire à la suite d'une modification dans la conformation stérique du substrat, le

rendant moins accessible aux enzymes ; ainsi, l'équilibre protéolytique (primaire vs secondaire) est modifié (Gillis, 2004).

La **plasmine**, une des principales protéases indigènes du lait, est associée aux caséines ; elle s'en dissocie à partir de pH 5,7 et se retrouve alors dans la structure du caillé fromager. Son activité est stimulée par des concentrations en NaCl allant jusqu'à 2 % et, bien qu'une certaine activité puisse persister jusqu'à 8 % en NaCl, elle est inhibée par de plus fortes concentrations (Guinee et Fox, 2004).

Peu d'études ont été réalisées au sujet de l'impact direct du NaCl et de l' a_w sur les **enzymes microbiennes** extracellulaires ou celles libérées lors de l'autolyse bactérienne. Il est toutefois connu qu'indirectement, via l'effet sur les qualités organoleptiques, l'activité des protéinases du ferment lactique serait inhibée par des niveaux modérément élevés de NaCl (concentrations non mentionnées) (Guinee et Fox, 2004).

1.2.2.2 Effets sur les propriétés physico-chimiques

Le NaCl peut affecter les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des fromages en interagissant avec certains de ses composés. En effet, la présence de sel permet la solubilisation partielle du calcium colloïdal associé aux micelles de caséines (Gillis, 2004) ; un phénomène intrinsèquement lié au pH du milieu, lequel est directement relié à la structure du fromage. Plus précisément, la solubilisation des caséines et para-caséines est augmentée en présence de NaCl (5 à 6 % S/H), ce qui leur permet de se lier davantage entre elles et avec la matière grasse, optimisant ainsi la formation du caillé et indirectement, la texture et la structure finales recherchées (Doyle et Glass, 2010). La présence de NaCl améliore aussi les interactions protéines-protéines et protéines-eau. Le niveau d'hydratation des protéines influence notamment la stabilité physico-chimique du caillé. Une modification de ces interactions peut conséquemment influencer les qualités rhéologiques et texturales du fromage (Cruz *et al.*, 2011 ; Doyle et Glass, 2010 ; Guinee et Fox, 2004). À ce sujet, Lesage *et al.* (1992) ont démontré que l'aspect et la texture de Camemberts réduits en NaCl (-62 %, -82 % et -100 % NaCl) étaient différents du contrôle (-0 %, $[\text{NaCl}]_{\text{totale}} = 2,1 \%$).

1.2.2.3 Effets sur les caractéristiques organoleptiques

L'ajout de sodium aux aliments permet d'augmenter leur palatabilité (Dötsch *et al.*, 2009), c'est-à-dire la sensation agréable ressentie en bouche par le consommateur (Gouvernement du Québec, 2011). Il est cependant difficile de déterminer une concentration en sodium à partir de laquelle un aliment est, ou non, palatable. En effet, la palatabilité étant un concept complexe à quantifier étant donné qu'il fait référence à une perception, un phénomène avant tout psychologique lié à l'expérience, et aux autres composantes de

l'aliment. Il est possible de « goûter » le NaCl via les récepteurs sur la langue seulement lorsqu'il est en solution (Doyle et Glass, 2010).

L'apport en sodium d'un fromage a des effets directs et indirects sur ses caractéristiques organoleptiques. D'abord, l'ion sodium (Na^+) influence directement la perception de la saveur salée (Gillis, 2004) et il détient un rôle majeur au niveau du rehaussement des saveurs et de leur transmission aux papilles gustatives. Le sodium peut aussi pallier à certains défauts organoleptiques, notamment en camouflant des goûts amers qui peuvent se dégager d'un fromage imparfait (Breslin et Beauchamp, 1997 ; Dötsch *et al.*, 2009 ; Doyle et Glass, 2010). Ensuite, le rôle du sel en relation avec la flaveur est intrinsèquement lié à son action sur les microflores du fromage ainsi que sur l'activité enzymatique. En modulant leur activité métabolique, il influence indirectement les composés aromatiques de flaveur qui peuvent être générés, ou non, par ces réactions métaboliques (Gillis, 2004 ; Johnson *et al.*, 2009). Par exemple, l'ajout de sel a un effet sur l'activité protéolytique de certaines enzymes (section 1.2.2.1.3), et donc sur l'amertume et/ou la fermeté du fromage (Gillis, 2004). La figure 5 présente, à titre d'exemple, les différences organoleptiques perçues lors de l'évaluation du profil sensoriel de Cheddars réduit et non réduit en NaCl (Gillis, 2004).

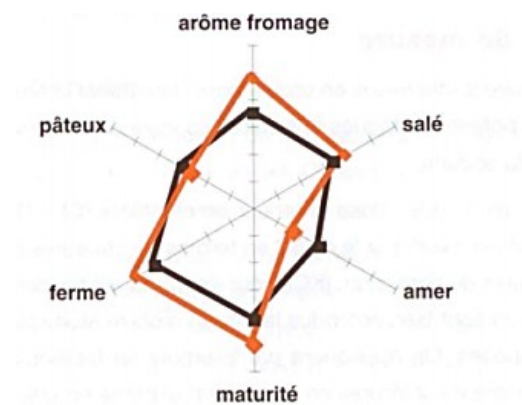


Figure 5. Profil sensoriel d'un fromage Cheddar selon le ratio S/H utilisé [profil noir : 2,6 %, profil orange : 3,7 %] (figure adaptée de Gillis (2004)).

1.2.2.4 Et l'ion chlorure...

La toxicité des halogènes sur les systèmes biologiques est connue, mais l'effet spécifique de l'ion chlorure (Cl^-) reste généralement mal défini (Taormina, 2010). Rockwell et Ebertz (1924) ainsi que Vuilleumard (2008) rapportent que le chlorure joue un rôle toxique sur les bactéries, en retirant l'oxygène du milieu. Il a aussi été démontré qu'en conditions salines optimales, l'ion Cl^- n'est pas nécessaire à la croissance bactérienne, alors qu'il le devient en conditions hyper osmotiques, notamment dans le cas de *S. aureus* (Taormina, 2010).

1.3 BACTÉRIES PATHOGÈNES RETROUVÉES DANS LE FROMAGE

Il existe quatre genres bactériens pathogènes responsables de la majorité des cas de toxi-infection alimentaire (TIA) dans le fromage, soit *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* et *S. aureus* (Donnelly, 2004). Selon le *Bilan des toxi-infections alimentaires du 1^{er} avril 2010 au 31 mars 2011* (Gouvernement du Québec, 2012), ces pathogènes ont respectivement causé 155, 31, 29 et 7 cas de TIAs confirmées au Québec lors de cette période. Notons que les cas relatifs à *S. aureus* peuvent avoir été sous-estimés puisque la maladie causée n'est pas à déclaration obligatoire.

1.3.1 *Listeria monocytogenes*

1.3.1.1 Caractéristiques générales

Le genre *Listeria* inclut six espèces, dont *L. monocytogenes* qui a été identifiée comme un pathogène alimentaire en 1981 (Todd et Notermans, 2011). La seconde espèce pathogène du genre est *L. ivanovii*, laquelle est toutefois spécifique aux animaux (Wagner et McLauchlin, 2008). Les quatre autres espèces, non pathogènes, sont *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. grayi* (Larparent, 2004 ; Rocourt et Buchrieser, 2007). En 2010, la nouvelle espèce *L. marthii* a été isolée et caractérisée (Graves *et al.*, 2010).

L. monocytogenes est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultative, catalase positive, non sporulante, en forme de court bâtonnet de 0,4 à 2 µm. Elle est généralement seule ou organisée en courtes chaînes et possède des flagelles péritriches, la rendant motile lorsque cultivée entre 20 et 25 °C (Larparent, 2004 ; Wagner et McLauchlin, 2008). Elle peut croître à des pH compris entre 4,3 et 9,8 et, étant psychrotrophe, à des températures variant entre 0,5 °C et 45 °C, avec un optimum de croissance à pH 7,1 et entre 30 et 35 °C (Adams et Moss, 2008 ; Lado et Yousef, 2007 ; Larparent, 2004). Son a_w minimale de croissance à 4 °C est de 0,92 lorsque le média est ajusté avec du NaCl (MAPAQ, 2010 ; Miller, 1992 ; Taormina, 2010) et de 0,90 à 30 °C (MAPAQ, 2010). L' a_w de croissance optimale de cette espèce est toutefois 0,97 (Larparent, 2004). *L. monocytogenes* est aussi plus résistante aux pH alcalins qu'acides et plus la température d'incubation est basse, plus son pH minimal de croissance est élevé (Larparent, 2004). Ces relations pH-température- a_w démontrent bien le concept de la technologie des barrières multiples (section 1.2.2.1.2).

Finalement, *L. monocytogenes* est halotolérante. Elle peut donc se développer et survivre à des concentrations élevées de sel. Certaines souches peuvent notamment survivre dans un milieu liquide contenant jusqu'à 16 % NaCl (Adams et Moss, 2008). Considérant l'importance de cette caractéristique dans le présent projet, ce point sera détaillé de manière indépendante à la section 1.3.1.4.

1.3.1.2 Facteur de virulence

Le principal facteur de virulence de *L. monocytogenes* est la listériolysine O (LLO), une toxine qu'elle synthétise et qui lui permet l'invasion cellulaire, la survie intracellulaire et la propagation de cellule à cellule de son hôte (Hamon *et al.*, 2012).

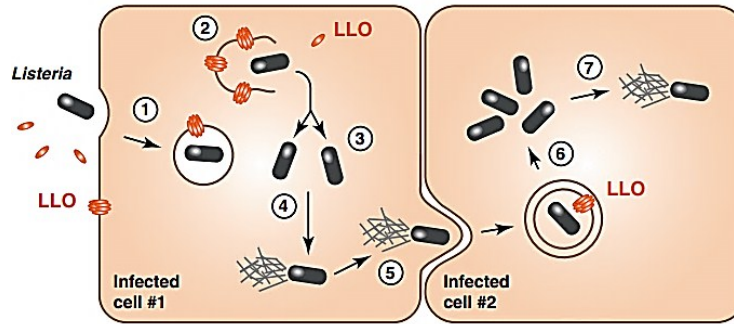


Figure 6. Mécanisme de virulence de *L. monocytogenes* (figure tirée intégralement de Hamon *et al.* (2012)).

Tel qu'illustré à la figure 6, la bactérie induit elle-même sa phagocytose, devenant ensuite prisonnière d'un phagosome (1). Le phagosome est déstabilisé par l'expression de la LLO et de phospholipases qui permettent l'évacuation de la bactérie (2). *L. monocytogenes* peut ensuite se répliquer dans le cytoplasme de la cellule infectée (3). Le gène *ActA* est également exprimé, ce qui induit la polymérisation de filaments d'actine (4) agissant comme un système de propulsion de *L. monocytogenes*, lui permettant de se propager à une autre cellule (5). Le cycle intracellulaire de réplication se répète par la suite (6) (7) (Hamon *et al.*, 2012 ; Lamont *et al.*, 2011 ; Portnoy *et al.*, 2002).

1.3.1.3 Listériose

1.3.1.3.1 Épidémiologie

Le taux d'incidence reliée à *L. monocytogenes* est relativement faible au Canada. En effet, de 2000 à 2008, Santé Canada (2010b) rapportait que l'incidence annuelle moyenne était de 0,367 cas / 100 000 habitants. Lorsqu'il y a un événement de contamination alimentaire par un microorganisme pathogène, le taux de mortalité est cependant plus élevé dans le cas des éclosions de listériose que pour les TIAs reliées à d'autres pathogènes (Ivanek *et al.*, 2004). Les TIAs causées par *L. monocytogenes* engendrent effectivement un décès dans 30 % des cas, comparé à 0,38 % pour *Salmonella enteritidis* et de 0,02 à 1,00 % pour *Campylobacter* spp. (Wagner et McLauchlin, 2008).

Entre 1983 et 2010, Santé Canada (2010b) a répertorié, dans différents pays, 21 cas d'éclosion de listériose dans les produits laitiers alors que Todd et Notermans (2011) en ont dénombré six dans les fromages, entre 2005 et 2008. Au Canada, depuis le début des années 1980, huit éclosions de listériose ont eu lieu, dont trois majeures : en 1981, dans une salade de chou (41 cas, dont 18 décès); en 2008, dans des produits de charcuterie (65 cas, dont 20 décès) et dans des fromages à pâte molle (38 cas, dont deux décès) (Farber, 2010 ; Gaulin *et al.*, 2012 ; Warriner et Namvar, 2009).

1.3.1.3.2 La pathologie

Le principal vecteur de transmission de *L. monocytogenes* est la consommation d'aliments prêts-à-manger³ contaminés, principalement la viande, la volaille et les produits laitiers (Todd et Notermans, 2011). La période d'incubation de la maladie peut être très variable, c'est-à-dire entre trois et 70 jours. Les symptômes majeurs sont la diarrhée, la fatigue, les nausées et les maux de tête (MAPAQ, 2010).

Les maladies associées à *L. monocytogenes* se présentent sous deux formes : bénigne et invasive (Todd et Notermans, 2011 ; Wagner et McLauchlin, 2008). La forme **bénigne** peut se développer chez une personne en santé, à la suite de l'ingestion d'une dose supérieure à 8 log ufc/g d'aliments. Cette forme de la maladie représente la majorité des cas et est généralement sans danger pour la vie humaine (Drevets et Bronze, 2008 ; Wagner et McLauchlin, 2008). La forme **invasive** affecte principalement les personnes immunodéprimées, notamment les systèmes nerveux et central (Wagner et McLauchlin, 2008). Conséquemment, la plupart des cas invasifs requièrent une hospitalisation (Todd et Notermans, 2011). Bien que mal définie à ce jour, la dose requise pour ce type d'infection serait de 100 à 1000 ufc/g d'aliments.

1.3.1.4 **Croissance en situation de stress osmotique**

Chez les bactéries, l'osmoadaptation se manifeste généralement de deux manières : par des changements physiologiques et par des variations dans l'expression des gènes (Gandhi et Chikindas, 2007). Des travaux de recherche ont démontré que la croissance de *L. monocytogenes* à 7 °C permet l'induction de gènes pour combattre les stress osmotiques. Plus spécifiquement, la bactérie synthétise une douzaine de protéines de réponse à un choc osmotique et d'acclimatation au stress. Elle peut aussi accumuler des composés osmoprotecteurs, tels la bêtaïne glycine, la bêtaïne proline, l'acétylcarnitine, la carnitine, la γ -butyrobêtaïne et le 3-diméthylsulphoniopropionate (Gandhi et Chikindas, 2007; Taormina, 2010). Ces derniers sont solubles et neutres au pH physiologique et peuvent s'accumuler sans affecter les fonctions cellulaires. La croissance des

³ Aliments prêts-à-manger : « [...] ne requièrent aucune préparation avant leur consommation, sauf peut-être pour ce qui est de les laver/rincer, de les décongeler ou de les réchauffer » (Santé Canada, 2010b).

cellules stressées est jusqu'à 2,6 fois supérieure en présence d'osmoprotectants qu'en l'absence de ces derniers (Gandhi et Chikindas, 2007).

1.3.1.4.1 Comportement de *L. monocytogenes* en milieu liquide

Le comportement de *L. monocytogenes* en milieu liquide salé a été étudié dans un nombre important de travaux. Le taux de croissance de *L. monocytogenes* est maximal lorsque la concentration en NaCl varie entre 4,5 et 5,5 % (Ribeiro *et al.*, 2006). De manière générale, les souches isolées de matrices fromagères sont particulièrement aptes aux phénomènes d'osmoadaptation et démontrent, en milieu salin, un taux de croissance supérieur aux souches isolées d'autres aliments ou à celles de référence (Faleiro *et al.*, 2003 ; Ribeiro *et al.*, 2006). Généralement, les cellules de *L. monocytogenes* commencent à s'osmoadapter après trois jours, notamment à 4 °C soit dans du lait additionné de 8 % NaCl ou dans une solution physiologique à 8 % NaCl (pH 5) (Bolton et Frank, 1999).

De manière générale, plus le **pH** du milieu de culture liquide est proche de celui optimum pour la croissance de *L. monocytogenes* (pH 7,1), plus sa phase de latence est courte et inversement proportionnelle à la concentration en NaCl dans le milieu. Une réduction du pH de une à deux unité(s) augmente la durée de la phase de latence, mais permet toujours la croissance du pathogène (Bereksi *et al.*, 2002 ; Boziaris *et al.*, 2007 ; McClure *et al.*, 1991). Certaines souches ont démontré un taux de croissance plus élevé en présence de conditions défavorables, telles qu'un pH inférieur à 5,0 ou supérieur à 8,0 et une concentration en NaCl supérieure à 10 % (Cole *et al.*, 1990 ; Ribeiro *et al.*, 2006). Dans un milieu sans NaCl, le pH minimum de croissance de *L. monocytogenes* était de 5,0, suggérant que sa croissance est davantage affectée par des conditions acides que par la présence de NaCl (Bereksi *et al.*, 2002 ; Boziaris *et al.*, 2007).

De plus, lorsque la **température** du milieu diminue, cela a un impact sur la tolérance de *L. monocytogenes* face à la présence de NaCl. Par exemple, à 8 °C dans un milieu contenant de 4 à 6 % NaCl (pH 5,5), la tolérance au NaCl de la bactérie est moindre qu'à 30 °C (Faleiro *et al.*, 2003). Toutefois, en présence de fortes concentrations en NaCl (13-14 %), le phénomène est différent, *L. monocytogenes* ayant démontré une croissance supérieure à 15 °C par rapport à 30 °C (Farber *et al.*, 1992). Ceci pourrait être expliqué par le ralentissement du métabolisme microbien à une température plus basse, ce qui lui permet de survivre plus longtemps à ces conditions hostiles (Cole *et al.*, 1990).

Le comportement de l'espèce est donc variable en fonction de la souche étudiée. La croissance de *L. monocytogenes* est néanmoins différente en milieu liquide et solide. En effet, le bouillon de culture permet à la bactérie d'assimiler facilement les nutriments nécessaires à sa croissance et le phénomène de diffusion

membranaire est aisément réalisé. Toutefois, ces nutriments sont plus difficiles à atteindre en milieu solide, notamment en matrice alimentaire (Koutsoumanis *et al.*, 2004 ; Schwartzman *et al.*, 2010).

1.3.1.4.2 Comportement de *L. monocytogenes* dans les fromages

1.3.1.4.2.1 Fromages à pâtes molles

Pendant les étapes de **fabrication** d'un fromage à pâte molle, la croissance de *L. monocytogenes* est supportée par le milieu, bien qu'elle soit modeste, considérant le faible pH et la compétition occasionnée par les microorganismes du ferment primaire. En effet, les études réalisées pendant la production d'une pâte molle démontrent une croissance moyenne de *L. monocytogenes* entre 0,62 et 2 log(s) depuis l'inoculation du lait jusqu'au salage (Leuschner et Boughtflower, 2002 ; Liu *et al.*, 2007 ; Ramsaran *et al.*, 1998 ; Ryser et Marth, 1987b).

Dans les fromages à pâtes molles, l'évolution du pH est un facteur déterminant pour la croissance microbienne, dont celle de *L. monocytogenes*. La croissance est dépendante de l'établissement et l'évolution du gradient de pH (Liu *et al.*, 2007 ; Ramsaran *et al.*, 1998 ; Ryser et Marth, 1987b). Tout au long de l'affinage, la croissance de *L. monocytogenes* est plus rapide à la surface du fromage plutôt qu'au centre, car l'activité protéolytique des ferments d'affinage fongique (section 1.1.1.2) permet une augmentation plus efficace du pH (Back *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 2007 ; Ramsaran *et al.*, 1998 ; Ryser et Marth, 1987b ; Terplan *et al.*, 1986). En effet, après un affinage entre 56 et 65 jours, des études ont montré des différences de concentration de *L. monocytogenes* variant entre 1 et 3,3 log(s) entre la surface et le centre de fromages à pâte molle (Back *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 2007 ; Ramsaran *et al.*, 1998 ; Ryser et Marth, 1987b ; Terplan *et al.*, 1986). Une étude vient toutefois en contradiction avec cette tendance générale. Les souches utilisées dans les travaux de Genigeorgis *et al.* (1991) ont montré un meilleur taux de croissance au centre plutôt qu'à la surface. Ceci résulte probablement du fait que le pathogène ait été inoculé dans un fromage Camembert commercial déjà formé plutôt que directement dans le lait utilisé pour sa confection. Ainsi, le gradient de pH était déjà bien établi au moment de l'inoculation dans la matrice fromagère, permettant une meilleure croissance de *L. monocytogenes*.

Pendant les **17 à 20 premiers jours d'affinage** d'un fromage à pâte molle, la plupart des études démontrent que la population de *L. monocytogenes* tend à rester stable ou à diminuer entre 1 et 2 log(s). Ceci est causé par le pH acide de l'environnement, la compétition des bactéries lactiques et la température d'affinage qui favorisent peu la croissance du pathogène (Leuschner et Boughtflower, 2002 ; Liu *et al.*, 2007 ; Ryser et Marth, 1987b).

À partir du **20^{ème} jour d'affinage** d'une pâte molle, la croissance de *L. monocytogenes* est généralement plus importante, par rapport à la concentration initiale, tant à la surface qu'au centre du fromage. En effet, la population de *L. monocytogenes* peut augmenter de 2 à 2,5 logs à la surface du fromage entre le 20^{ème} et le 65^{ème} jour d'affinage (Ryser et Marth, 1987b). D'autres auteurs ont observé une augmentation du même ordre dès le 35^{ème} jour (Liu *et al.*, 2007). En contradiction, la population de l'une des souches l'étude de Leuschner et Boughtflower (2002) est demeurée stable (25 ufc/g) pendant l'affinage, après avoir atteint cette concentration à la fin de la transformation. Cette étude se démarque des autres puisqu'un faible inoculum (0,1 à 1 ufc/mL) de *L. monocytogenes* a été utilisé. Il a été démontré que la grosseur de l'inoculum utilisé pouvait avoir un impact sur la croissance subséquente de *L. monocytogenes* (Robinson *et al.*, 2001).

La croissance de *L. monocytogenes* (inoculum 10² ufc/g) dans un Camembert a été étudiée en fonction de la température (Back *et al.*, 1993). Après un affinage de 40 jours, les températures 3, 6, 10 et 15 °C ont permis la croissance du pathogène en surface alors qu'au centre, la croissance a été observée seulement à 15 °C. À la surface, lors d'un affinage à 3 ou 6 °C, une augmentation de 2 logs de *L. monocytogenes* a été remarquée, alors qu'en utilisant des températures de 10 ou 15 °C, la croissance était plus importante, soit de 3 à 4 logs.

1.3.1.4.2.2 Autres variétés de fromage

Plusieurs études ont démontré que la croissance de *L. monocytogenes* était modeste ou difficile dans le fromage Cheddar (Mehta et Tatini, 1992 ; Ryser et Marth, 1987a ; Shrestha *et al.*, 2011). En effet, pendant la fabrication et les 14 à 21 premiers jours d'affinage du Cheddar, le dénombrement de *L. monocytogenes* peut être stable ou augmenter légèrement, entre 0,1 à 0,8 log, sans égard à la température d'affinage, variant entre 6 et 13 °C (Ryser et Marth, 1987a). Pour la suite de l'affinage, des analyses après 70 jours ont montrés une diminution de la population de *L. monocytogenes* entre 0,14 et 1,48 log (Mehta et Tatini, 1992 ; Shrestha *et al.*, 2011). Une souche a été dénombrée à 125 ufc/g après une année complète d'affinage (Ryser et Marth, 1987a).

L'effet de la réduction du sel dans ce type de fromage a aussi été étudié (Mehta et Tatini, 1992; Shrestha *et al.*, 2011). Mehta et Tatini (1992) ont observé qu'une réduction de 52 % du NaCl ([NaCl]_{totale} 1,3 %) dans le Cheddar permettait de réduire davantage (4,33 logs) la population de *L. monocytogenes* alors que Shrestha *et al.* (2011) n'ont noté aucune différence lorsque le fromage était réduit de 38 % en NaCl ([NaCl]_{totale} 0,7 %) comparé à un avec une teneur en NaCl standard ([NaCl]_{totale} 1,8 %). Ces auteurs ont aussi démontré que, à l'égard de l'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* dans un Cheddar, la barrière du pH apparaissait être plus efficace que celle du sel (Shrestha *et al.*, 2011).

La croissance de *L. monocytogenes* est aussi supportée par d'autres variétés de fromages, telles que le Teleme, le Brie et le Ricotta ainsi que dans certaines pâtes molles hispaniques comme le Queso Fresco et le Panela Ranchero (Genigeorgis *et al.*, 1991). Le Cotija, le Bleu, le Tillamook, le Monterey Jack, le Suisse, le Colby, le Provolone, le Muenster, le Kasserli et le Limburger sont des fromages qui ne supportent pas la croissance de *L. monocytogenes*, de même que le Cottage (Genigeorgis *et al.*, 1991). À titre d'exemple, après avoir été inoculée dans un fromage Cottage, la population de *L. monocytogenes* avait diminué de 0,58 log après 24 jours à 5 °C (Piccinin et Shelef, 1995). Finalement, le fromage Feta ne supporte pas la croissance de *L. monocytogenes*, mais peut assurer sa survie lorsqu'il a été fabriqué à partir de lait cru (Genigeorgis *et al.*, 1991 ; Ramsaran *et al.*, 1998).

1.3.1.5 Classification de *L. monocytogenes* par sérotypage

Le sérotypage est une technique qui permet la caractérisation de différentes souches en fonction de leur composition antigénique. Des solutions, dans lesquelles sont solubilisés des anticorps, sont placées en présence des souches bactériennes à l'étude. Dans le genre *Listeria*, 15 antigènes somatiques (I à XV) et cinq antigènes flagellaires (A à E) peuvent être distingués (Annexe I). La combinaison de ces facteurs permet de différencier 17 sérotypes dans le genre, dont 12 associés à l'espèce *L. monocytogenes*. À la suite de réactions positives d'agglutination anticorps-antigène, le sérotype peut alors être déterminé (Henriksen, 1978 ; Larpent, 2004; Seeliger et Höhne, 1979 ; Wagner et McLauchlin, 2008).

Sept des sérotypes connus de *L. monocytogenes* (Ribeiro *et al.*, 2006 ; Wagner et McLauchlin, 2008) ont été répartis en trois lignées génétiques (I, II, III) (Tableau 3).

Tableau 3. Sérotypes associés aux lignées génétiques de *L. monocytogenes* et nombre de cas relatifs.

Lignée	Sérotypes	Cas humains		Cas animaux (%)
		Invasifs (%)	Bénins (%)	
I	1/2b, 3c, 4b	92,9	62,9	42,1
II	1/2a, 3a	7,1	36,2	47,4
III	4a, 4c	0	1,0	10,5

Adapté de Bergholz *et al.* (2010) et Jeffers *et al.* (2001).

Les souches appartenant à la **lignée I** sont majoritairement associées aux cas de listériose humaine (Tableau 3), particulièrement celles associées aux sérotypes 1/2b et 4b (Bergholz *et al.*, 2010 ; Jeffers *et al.*, 2001 ; Wagner et McLauchlin, 2008). Les souches de la **lignée II** sont principalement isolées d'aliments ou de l'environnement et ont une déficience à s'adapter aux stress salins, en comparaison avec celles des lignées I et III (Bergholz *et al.*, 2010). Le sérotype 1/2a est celui le plus fréquemment isolé dans un environnement de transformation alimentaire (Jadhav *et al.*, 2012) et a été prédominant au Canada entre 1988 et 2010 dans les cas de listériose humaine (Knabel *et al.*, 2012). Finalement, les souches de la **lignée III** sont plutôt associées à la listériose animale.

Cependant, l'information contenue dans l'article de Bergholz *et al.* (2010) semble incomplète puisqu'ils ne font état que de sept sérotypes (Tableau 3) alors que la charte utilisée par le *Laboratoire national de microbiologie* (Agence de la santé publique du Canada) distingue maintenant 12 sérotypes pour *L. monocytogenes*, dont 1/2c, 3b, 4ab, 4d et 4e, lesquels n'ont pas été mentionnés dans l'article cité (Annexe I).

1.3.2 *Staphylococcus aureus*

1.3.2.1 Caractéristiques générales

Le genre *Staphylococcus* inclut 41 espèces, dont *Staphylococcus aureus*, une bactérie à Gram positif, catalase positive, oxydase négative et non sporulante. Les coques, ayant un diamètre entre 0,7 et 1,2 µm, peuvent être isolées ou agglutinées, que ce soit en paires, en chaînes ou en grappes. La bactérie n'est pas motile, possède un métabolisme aérobie ou anaérobie facultatif et a la capacité de former des biofilms (Escobar, 2009 ; Gillaspay et landolo, 2009 ; Hennekinne, 2009). *S. aureus* peut se développer à des pH variant entre 4,0 (aérobie) ou 4,6 (anaérobie) et 9,8 et à des températures entre 7 et 48 °C, avec un optimum de croissance à pH neutre et à une température entre 35 et 37 °C (Adams et Moss, 2008 ; Cretenet *et al.*, 2011a).

S. aureus est une bactérie halotolérante, sa croissance est donc possible en présence de 0 à 20 % de NaCl, mais est optimale entre 0,5 et 4,0 %. L' a_w optimale pour sa croissance varie entre 0,98 et 0,99 ; bien qu'elle puisse aussi se développer à une a_w aussi faible que 0,83 (aérobie) ou 0,90 (anaérobie) (Adams et Moss, 2008 ; Cretenet *et al.*, 2011a ; Gillaspay et landolo, 2009). La croissance en stress osmotique est détaillée subséquemment à la section 1.3.2.4.

1.3.2.2 Facteur de virulence

S. aureus possède plusieurs facteurs de virulence, notamment la production d'exoenzymes et de toxines, dont les entérotoxines staphylococciques (ES), lesquelles causent des TIAs (Escobar, 2009 ; Oogai *et al.*, 2011). Une toxine est un « élément extracellulaire capable d'affecter la fonction ou la morphologie des cellules de l'hôte » (Escobar, 2009). Les ESs sont de petites protéines hydrosolubles (24 à 28 kg/mol) sécrétées par certaines souches de *S. aureus* (Cretenet *et al.*, 2011a). L'aptitude à produire une ES est possible selon les paramètres présentés au tableau 4.

Tableau 4. Conditions environnementales permettant à *S. aureus* de produire une entérotoxine.

Paramètres	Optimum	Gamme possible
Aw	0,99	≥ 0,86
pH	5,3 à 6,8 (ES type A) 6,0 à 8,0 (autres types)	4,8 à 9,0 n/d ^a
Température (°C)	34 à 40	10 à 45
NaCl (%)	0,5	0 à 20
Atmosphère en CO ₂ (%)	5 à 20	< 5

a : n/d : non-disponible

Adapté de Adams et O Moss (2008) et Cretenet *et al.* (2011a).

Les ESs sont très **stables** ; elles résistent à la plupart des enzymes protéolytiques ainsi qu'à des conditions qui pourraient détruire *S. aureus*, comme des traitements de chaleur. L'ES peut demeurer fonctionnelle dans le milieu, même lorsque *S. aureus* a été détruit (Schelin *et al.*, 2011) : la non-détection de *S. aureus* n'est donc pas un gage de sécurité alimentaire. De plus, les ESs peuvent devenir immunologiquement indétectables à la suite d'un traitement thermique tout en restant actives (*i.e.* toxiques) (Cretenet *et al.*, 2011a ; Hennekinne, 2009).

Malgré son importance, le **mécanisme de production** des ESs par *S. aureus* est peu documenté et apparaît être hétérogène parmi les 21 types identifiés à ce jour (Cretenet *et al.*, 2011a). Les ESs mieux connues sont les types A, B, C, D et E, dont l'implication dans les TIAs a été clairement démontrée (Hennekinne, 2009). En culture pure, les ESs B, C et D sont généralement exprimées durant la transition entre les phases

exponentielle et stationnaire alors que l'ES A est exprimée à partir de la moitié de la phase exponentielle (Balaban et Rasooly, 2000 ; Cretenet *et al.*, 2011a). Toutefois, dans les aliments, la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxine pourraient être découplées (Schelin *et al.*, 2011). Le type de gènes relatifs à la production d'ESs est extrêmement variable d'une souche à l'autre, mais est souvent commun aux souches partageant un même milieu de croissance (ex. hôte, aliment, milieu synthétique) (Schelin *et al.*, 2011). Les gènes de toxines peuvent être codés par des plasmides, des phages ou des îlots de pathogénicité génomiques (Cretenet *et al.*, 2011a ; Oogai *et al.*, 2011). Cependant, il a été démontré que la seule présence d'un gène dans le matériel génétique d'une souche de *S. aureus* n'était pas nécessairement liée avec la production de la toxine (Loncarevic *et al.*, 2005). Il est donc impossible de généraliser le mécanisme d'expression des ESs.

Le **mode d'action** des entérotoxines sur l'humain est lui aussi peu documenté. Les ESs sont reconnues pour leurs pouvoirs émétique et superantigénique. Les entérotoxines stimuleraient les centres émétiques et le transit intestinal en agissant directement sur l'épithélium intestinal et le nerf vague (Hennekinne, 2009). Le pouvoir superantigénique des ESs est expliqué par une stimulation exagérée de la prolifération des lymphocytes T, provoquant une production excessive de cytokines inflammatoires et conséquemment un choc toxique chez l'hôte (Balaban et Rasooly, 2000). Aucune relation n'a été établie à ce jour entre les effets émétiques et superantigéniques. Finalement, les mécanismes permettant à *S. aureus* de devenir invasif via l'intestin restent inconnus (Balaban et Rasooly, 2000).

1.3.2.3 Intoxication à l'entérotoxine de *S. aureus*

1.3.2.3.1 Épidémiologie

S. aureus est la première cause d'infection bactérienne au monde (Gillaspy et landolo, 2009). Le taux d'incidence annuel des infections invasives à *S. aureus* est de 28 cas pour 100 000 habitants en Amérique du Nord (Laupland *et al.*, 2003). Au Canada, le taux d'incidence relié spécifiquement à l'intoxication causée par l'ES est toutefois difficile à évaluer puisque cette maladie n'est pas à déclaration obligatoire (ASPC, 2003).

Crago *et al.* (2012) ont étudié le taux de contamination à *S. aureus* dans 693 échantillons alimentaires reliés à des TIAs en Alberta (Canada) entre 2007 et 2010. Environ 12 % des échantillons étaient contaminés par *S. aureus*. Entre 70 et 95 % des souches de *S. aureus* isolées d'aliments responsables de TIAs seraient entérotoxigènes et l'ES A serait celle prédominante dans plusieurs pays (Hennekinne, 2009).

1.3.2.3.2 La pathologie

Deux types de maladies peuvent être causées par *S. aureus* : les infections suppuratives, qui dépendent de la prolifération de la bactérie elle-même, comme l'infection d'une plaie ou d'un organe, et les infections toxiques (*i.e.* intoxications) où la sécrétion d'une toxine est en cause, comme le cas des TIAs et du syndrome du choc toxique (Corne, 2004).

Il est généralement accepté qu'une ingestion supérieure à 10^6 ufc *S. aureus*/g d'aliment contaminé est requise pour que la quantité de toxines présente soit suffisante pour engendrer la maladie (Tatini *et al.*, 1971). La dose toxique reste néanmoins mal définie. Hennekinne (2009) suggère qu'une quantité variant entre 50 et 200 ng toxines/kg poids corporel, *i.e.* entre 10 et 20 µg de toxines staphylococciques, seraient nécessaires pour causer une intoxication. Les symptômes, tels que des nausées, des vomissements et des crampes abdominales, sont généralement bénins et ressentis après une courte période d'incubation entre une et six heures (MAPAQ, 2010). Étant donné que la rémission a lieu dans les 24 à 48 heures, la plupart des personnes malades ne consultent pas le médecin.

1.3.2.4 **Croissance de *S. aureus* et production d'entérotoxine en situation de stress osmotique**

De manière similaire à *L. monocytogenes*, l'osmotolérance de *S. aureus* est due à sa capacité de conserver l'intégrité de sa membrane cellulaire par différents systèmes, notamment en accumulant des osmoprotectants tels la proline, la glycine bêtaïne, la proline bêtaïne, la choline et la taurine (Hajmeer *et al.*, 2006). Trois minutes après son exposition à une forte concentration en NaCl, *S. aureus* est notamment apte à augmenter par 21 fois sa concentration intracellulaire de proline (Townsend et Wilkinson, 1992).

1.3.2.4.1 Comportement de *S. aureus* en milieu liquide

La croissance de *S. aureus* a principalement été étudiée dans le milieu de culture liquide *brain heart infusion* (BHI). Les résultats diffèrent entre les diverses études ; principalement en raison des différentes températures d'incubation utilisées et probablement aussi en fonction des souches. D'abord, à la suite de périodes d'incubation de 12 et 24 heures à 35 °C, une concentration de 5 % NaCl dans ce milieu a stimulé la croissance de *S. aureus* par rapport au même milieu sans NaCl (Hajmeer *et al.*, 2006). D'autres ont démontré qu'à 15 °C, plus la teneur en NaCl du milieu augmentait (0 à 18,17 %), plus le taux de croissance diminuait et la phase de latence augmentait ; sauf dans le cas de la teneur en NaCl à 18,17 %, où la phase de latence a diminué (Medvedová *et al.*, 2009).

De plus, dans un milieu BHI additionné de 10 % de NaCl, les cellules de *S. aureus* ont présenté davantage de dommages physiques que dans celui à 5 % mais elles étaient toutefois encore capables de se multiplier (aucun ordre de grandeur quant à la croissance bactérienne n'a été avancé dans l'étude). Aussi, l'utilisation d'un sel ayant une granulométrie grossière a généralement permis une meilleure croissance qu'avec un sel fin (Hajmeer *et al.*, 2006).

Des modèles ont aussi été élaborés afin de prédire la croissance de *S. aureus* en fonction de différents paramètres. Sutherland *et al.* (1994) ont élaboré un modèle relatif à sa croissance dans un milieu BHI en fonction la teneur en NaCl (0,5 à 13,5 %), du pH (4,0 à 7,0) et de la température (10 à 30 °C). Un autre modèle a été développé en fonction de l'humidité relative et du pH d'un aliment (Stewart *et al.*, 2002). L'utilisation de ce modèle a démontré que la croissance de *S. aureus* était possible à des pH entre 4,5 à 7,0 et à une humidité relative (HR) de 95 %.

Or, comme dans le cas de *L. monocytogenes*, afin d'être en mesure de comprendre le risque réel relié à ce pathogène, il convient de l'étudier *in situ* dans un aliment puisqu'il a été démontré que la croissance de *S. aureus* en milieu liquide était différente de celle à l'intérieur d'un aliment (Schelin *et al.*, 2011).

1.3.2.4.2 Comportement de *S. aureus* dans les fromages

1.3.2.4.2.1 Fromages à pâtes molles

La croissance et la production d'ESs de souches de *S. aureus* ont été étudiées pendant la **fabrication** et l'affinage de fromages à pâte molle, lesquels détiennent une a_w suffisamment élevé (0,96 à 0,98) pour permettre la croissance de ce pathogène (Cretenet *et al.*, 2011a). D'abord, pour un inoculum de 5 ou 6 logs, des entérotoxines peuvent être détectées au cours de la fabrication de fromages à croûte fleurie alors que la population de *S. aureus* augmente simultanément jusqu'à 1,54 log de plus (Meyrand *et al.*, 1998 ; Necidová *et al.*, 2009). L'équipe de Necidová *et al.* (2009) a toutefois remarqué que la concentration de la toxine diminuait après le pressage et a suggéré que, considérant que l'ES soit hydrosoluble, il était plausible qu'elle ait été évacuée du caillé lors de l'expulsion du lactosérum. Pour des inoculums plus faibles (2 à 4 logs), la toxine n'a pas été détectée, mais la croissance de *S. aureus* était supérieure, soit une augmentation de 3,01 à 3,54 logs (Meyrand *et al.*, 1998).

Après cinq jours d'**affinage** d'une pâte molle à 8 °C, la population de *S. aureus* avait diminuée d'environ deux logs bien que la concentration d'ES soit restée relativement stable par rapport au premier jour d'affinage (Necidová *et al.*, 2009). À la fin d'une période d'affinage de 42 jours, une augmentation des comptes de

S. aureus à la surface du fromage variait entre 0,02 à 3,01 log(s) par rapport aux concentrations initiales, alors que ceux au centre variaient entre 0,53 et 2,81 log(s) (Meyrand *et al.*, 1998). Vernozy-Rozand *et al.* (1998) n'ont toutefois plus détecté le pathogène ni à la surface ni au centre du fromage à partir respectivement du 21^{ème} et 35^{ème} jour d'affinage. L'ES A n'a jamais été détectée lorsqu'un inoculum de deux logs et moins était utilisé alors que pour des inoculums supérieurs, plus la concentration était élevée, plus la toxine était détectée en concentration élevée et tôt par rapport à la fin de la fabrication (Meyrand *et al.*, 1998 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 1998). Ceci démontre l'importance de la concentration initiale de *S. aureus* dans la production d'entérotoxine. Cretenet *et al.* (2011b) ont aussi démontré que l'expression de gènes de virulence de *S. aureus* était fortement altérée par la matrice fromagère elle-même ainsi que par la présence de *Lactococcus lactis*.

1.3.2.4.2.2 Autres variétés de fromage

La croissance de *S. aureus* n'est pas supportée dans l'Emmental ni dans le Gruyère alors qu'elle peut l'être dans le St-Nectaire (Cretenet *et al.*, 2011a). Dans un fromage Cheddar, la croissance de *S. aureus* est modeste et favorisée par la présence de NaCl (Cretenet *et al.*, 2011a ; Koenig et Marth, 1982). En effet, pendant la transformation, la population de *S. aureus* a augmenté en moyenne de 3,5 logs entre le moment de l'inoculation jusqu'à l'étape du pressage et ce, peu importe la teneur en NaCl (0, 1,2 ou 2,4 %). Cependant, à la fin d'une période d'affinage de 56 jours, *S. aureus* avait survécu (diminution < 1 log) dans les Cheddars salés ([NaCl]_{totale} entre 1,2 et 2,4 %) alors qu'une réduction d'environ 2 logs a été observée dans le Cheddar sans sel par rapport à la fin de la fabrication. De plus, les concentrations de l'ES A variaient entre 0,12 et 0,34 ng/g dans tous les Cheddars en fin d'affinage et n'étaient pas reliées à la concentration en sel. La détection de la toxine a été possible bien que l'inoculum ait été en moyenne de 2,73 log (Koenig et Marth, 1982). Une autre étude a analysé l'effet de ferments lactiques sur la croissance de *S. aureus* et la synthèse d'ES A (Tatini *et al.*, 1971). Dans celle-ci, il a été établi qu'un inoculum de *S. aureus* de $2,5 \times 10^5$ ufc/mL, qui était en mesure de croître de 2 logs, était nécessaire pour détecter une ES dans un Cheddar ([NaCl]_{totale} 1,5 %). Cependant, en l'absence de ferments lactiques, un inoculum de 2×10^3 ufc/mL était suffisant pour la détection de la toxine (Tatini *et al.*, 1971). Ces mêmes auteurs ont observé la persistance de l'ES A pendant trois ans dans le fromage.

Dans un fromage Feta, une croissance de 2 ou 3 logs de *S. aureus* a été observée pendant les 24 premières heures lorsque le fromage était inoculé entre 5 et 7 logs. Après 75 jours d'affinage, le compte de *S. aureus* avait diminué en deçà du niveau d'inoculation, et ce, en fonction, entre autres, de la concentration en sel et de l'activité du ferment lactique (Erkmen, 1995). Finalement, dans le fromage de type Suisse, lorsqu'inoculé dans le lait pendant la transformation, *S. aureus* peut croître pendant 24 heures et, après 14 jours, atteindre une

concentration maximale de 2×10^8 ufc/g. La population diminue pendant les 19 semaines subséquentes d'affinage (Tuckey *et al.*, 1964).

1.3.2.5 Classification par MLST

Le *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) utilise des fragments de six à huit gènes domestiques (*housekeeping genes*) afin de réaliser le génotypage de souches. Cette méthode de séquençage permet de mesurer les variations alléliques et de comparer les souches à l'intérieur d'une même espèce. Un des avantages de la technique est la comparaison rapide des résultats obtenus par différents laboratoires, permettant ainsi une surveillance épidémiologique à long terme (Sullivan *et al.*, 2005). Un schéma MLST a été développé en 2000 pour *S. aureus* et a été révisé en 2012 (Enright *et al.*, 2000 ; Larsen *et al.*, 2012).

Tableau 5. Les sept gènes conservés utilisés pour le MLST de *S. aureus*.

Abréviation	Nom complet du gène	Longueur du fragment à amplifier (pb)
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	456
<i>aroE</i>	Shikimate déhydrogenase	456
<i>glpF</i>	Glycérol kinase	465
<i>gmk</i>	Guanylate kinase	417 ^a
<i>pta</i>	Phosphate acetyltransférase	474
<i>tpi</i>	Triosephosphate isomérase	402
<i>yqi</i>	Acétyl coenzyme A acétyltransférase	516

a : Le fragment était de 429 pb avant la révision de 2012 (Larsen *et al.*, 2012).

Le principe de base de la méthode MLST est présenté à la figure 7. D'abord, une amplification par réaction en chaîne polymérase (PCR) et le séquençage de fragments d'environ 450 paires de bases (pb) sont réalisés pour chacun des sept gènes (Tableau 5). La séquence nucléotidique obtenue pour un gène d'une souche donnée est appelée un allèle. Un chiffre arbitraire est ensuite attribué à chacun des différents allèles identifiés. Cependant, les souches partageant la même séquence nucléotidique se voient attribuer le même numéro d'allèle. Les allèles de chaque gène sont ensuite regroupés pour former la séquence type (ST) correspondante (Sullivan *et al.*, 2005). Les ST obtenues permettent une étude phylogénétique de la population de *S. aureus* étudiée et peuvent aussi être comparées à d'autres dans une banque de données web, contenant plus d'un millier de souches (<http://saureus.mlst.net>). Les allèles des gènes *arcC* et *aroE* sont les plus variables pour *S. aureus*, ce qui permet conséquemment une plus grande discrimination entre les souches. Les allèles des gènes *glpF* et *gmk* sont ceux présentant le moins de variations nucléotidiques et sont donc les plus uniformes (Enright *et al.*, 2000).

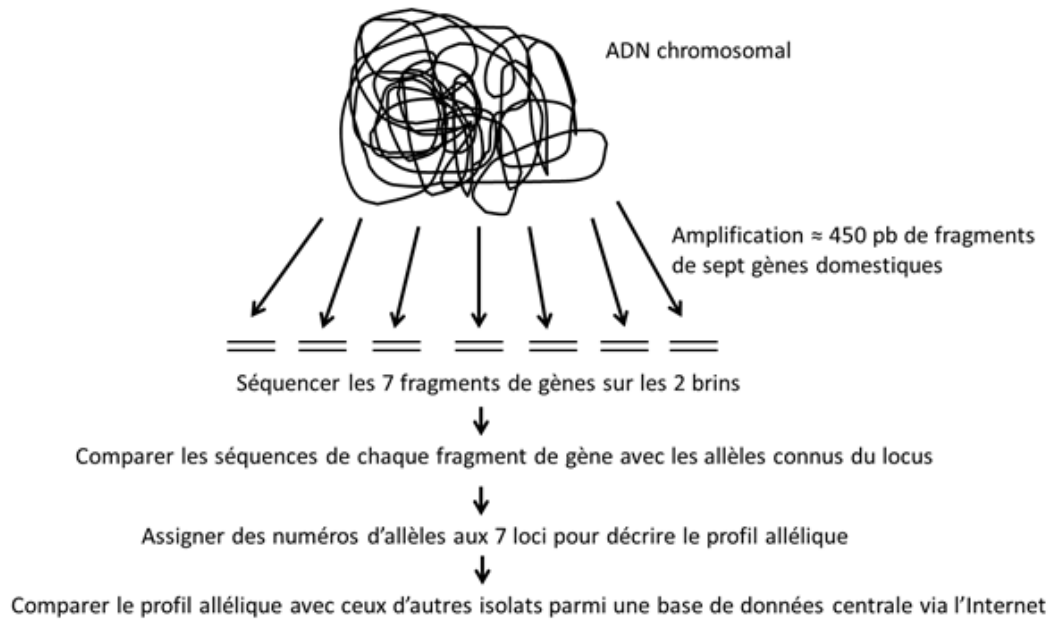


Figure 7. Principe du MLST (figure adaptée de Spratt (1999)).

1.4 STRATÉGIES DE RÉDUCTION DU NaCl DANS LES ALIMENTS

Plusieurs stratégies ont été suggérées afin de réduire le sodium dans les aliments (Tableau 6). La **stratégie la plus prometteuse** est celle de réduire graduellement le sodium dans les aliments afin de permettre au consommateur de s'y adapter (Dötsch *et al.*, 2009). Une réduction graduelle de 10 à 25 % est généralement sans impact d'un point de vue technologique et est difficile à détecter pour le consommateur (Dötsch *et al.*, 2009). Dans les fromages, cette stratégie ainsi que l'utilisation de substituts de sel sont les principales approches utilisées (Sutherland, 2002). Réduire le sodium dans le fromage implique l'augmentation de l' a_w et peut donc avoir des conséquences sur l'écologie microbienne (section 1.2.2.1.2). Une hausse de l'activité de l'eau, même minime, pourrait se traduire par une modification du **risque** associé au développement de microorganismes pathogènes.

Tableau 6. Stratégies utilisées pour réduire le sodium dans les aliments.

Approches	Caractéristiques
Adaptation du consommateur	
Réduction graduelle du sel	<ul style="list-style-type: none"> - Entraîner le palais des consommateurs afin qu'il s'adapte à une diète réduite en sel. - Réduire le sel par plusieurs petites étapes.
NaCl modifié	
	<ul style="list-style-type: none"> - Granulométrie plus fine : le goût salé détecté est plus intense si la taille est cristaux est réduite. - Sel dendritique (plus poreux) : se dissout plus rapidement.
Exploiter les principes relatifs à la perception du goût	
	<ul style="list-style-type: none"> - Développer et exploiter les connaissances sur les principes multifactoriels relatifs aux perceptions des goûts (ex. mieux comprendre les interactions goût-odeur). - Utiliser des composés aromatiques qui peuvent améliorer la perception du goût salé (ex. le chlorure de choline).
Substituts de sel	
Sels minéraux	<ul style="list-style-type: none"> - Mélanges NaCl:KCl. - Sels minéraux recristallisés (ex. <i>Oceans Flavor, Eco Salt, Solo Salt</i>).
Rehausseur de goût salé à base d'extraits de protéines	<ul style="list-style-type: none"> - Protéines laitières (ex. <i>Savoury Powder</i>). - Protéines oléagineuses.
Molécules naturelles stimulatrices de la saveur umami	<ul style="list-style-type: none"> - Molécules naturelles qui rehaussent le goût salé (ex. <i>Mycoscent</i> provient de la fermentation de moisissures). - Utilisation du tréhalose, un glucide retrouvé dans les champignons et les artichauts.
Autres additifs	
	<ul style="list-style-type: none"> - Additifs, tels le sucrose, la thaumatococine, l'acide dihydroxybenzoïque et ses sels, qui interfèrent et bloquent les saveurs amères et métalliques des substituts (ex. <i>PAN salt</i>). - Extraits de levures à haute teneur en ribonucléotides qui masquent l'arrière-goût métallique du KCl (ex. <i>Maxarome Select</i>). - Sucres, épices, herbes, composés aromatiques qui imitent le goût salé.

Adapté de Dötsch et al. (2009), Doyle et Glass (2010), Lawrence et al. (2009) et Locke et Fielding (1994).

1.4.1 Sels de remplacement dans les fromages

Dans les fromages, l'utilisation de sels de remplacement, où le sodium est habituellement substitué par un autre cation a été documentée (Taormina, 2010). Les principaux défis liés à l'utilisation de sels de remplacement dans les fromages sont liés à la qualité organoleptique du produit et à l'efficacité du substitut contre la croissance des pathogènes. D'emblée, certains sels qui présentaient des caractéristiques d'équivalence intéressantes, comme le $MgCl_2$ et le $CaCl_2$, ne peuvent pas être utilisés puisqu'ils ont conféré des propriétés texturales et organoleptiques inacceptables aux fromages, telles une texture friable, molle ou grasse ainsi que des arrière-goûts métallique et/ou amer et/ou de savon (Fitzgerald et Buckley, 1985 ; Grummer *et al.*, 2012 ; Guinee et O'Kennedy, 2007 ; Lesage *et al.*, 1993). Le lithium (Li^+) est le seul cation qui présente un goût primaire salé s'apparentant à celui du sodium ; mais son utilisation n'est toutefois pas recommandée étant donné qu'il est toxique aux concentrations ciblées (Dötsch *et al.*, 2009 ; Doyle et Glass, 2010). À ce jour, le chlorure de potassium (KCl) est le substitut le plus prometteur pour remplacer partiellement le NaCl dans les fromages.

1.4.1.1 KCl

1.4.1.1.1 Aspects législatifs et nutritionnels

Au Canada, l'ajout de KCl dans les aliments est permis lorsqu'il agit à titre de stabilisant, de nourriture pour les levures (ex. dans la fabrication du pain et de la bière) ou comme ajusteur du pH. L'utilisation du KCl comme substitut au NaCl n'est permise dans aucun cas. La législation à ce sujet n'a toutefois pas été révisée depuis 2006 (Santé Canada, 2006). Cependant, en vertu du projet de loi C38 (*Loi sur l'emploi, la croissance et la prospérité durable*), la *Loi sur les aliments et drogues* pourrait prochainement être modifiée dans le but d'assouplir et d'accélérer le processus d'approbation de certains additifs alimentaires, dont les substituts de sel. Récemment, quatre additifs alimentaires ont été approuvés dans le cadre de la stratégie de réduction du sodium : le pyrophosphate acide de calcium, l'acide sorbique, le sorbate de potassium et le sorbate de calcium (AAC, 2012)

Bien que non approuvée pour le moment, l'utilisation du KCl comme sel de remplacement apparaît être doublement avantageuse, car elle permet de réduire le sodium, tout en augmentant l'apport en potassium. Cet élément nutritif est généralement en carence dans la diète humaine et aussi reconnu pour réduire la pression artérielle (Dötsch *et al.*, 2009 ; Geleijnse *et al.*, 2003). Une augmentation de l'apport du potassium de 1,8 à 1,9 g/jour diminuerait effectivement la pression artérielle des patients hypertendus (Karppanen et Mervaala, 2006). Néanmoins, les personnes ayant des problèmes rénaux, au niveau du débit de la filtration

glomérulaire, soit environ 0,1 % de la population américaine, devraient surveiller leur apport en potassium (Santé Canada, 2010a).

1.4.1.1.2 KCl dans les fromages

1.4.1.1.2.1 Aspects organoleptiques et texturaux

Il a été proposé que le KCl pourrait remplacer le NaCl jusqu'à une proportion de 30 % sans affecter significativement la texture et le goût de certains fromages, dont le Cheddar et le Feta (Fitzgerald et Buckley, 1985 ; Grummer *et al.*, 2012 ; Katsiari *et al.*, 2000 ; Reddy et Marth, 1993). Il a été démontré que des Cheddars ayant une teneur finale en sels de 1,25 à 1,75% obtenues par l'utilisation d'un ratio équimolaire 1NaCl:1KCl (substitution de 50 %), étaient tous jugés acceptables par un panel de dégustateurs, mais qu'une saveur d'amertume était observée (Fitzgerald et Buckley, 1985 ; Lindsay *et al.*, 1982). Par contre, une autre étude a démontré que, lorsqu'un maximum de 33 % de KCl remplaçait le NaCl, un Cheddar expérimental présentait des résultats comparables aux niveaux organoleptique et textural à ceux obtenus avec un Cheddar témoin (Reddy et Marth, 1993). Il a aussi été démontré que la substitution partielle (33 et 50 %) du NaCl par du KCl n'affectait pas négativement l'activité du ferment lactique (Reddy et Marth, 1995).

1.4.1.1.2.2 Impacts sur la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*

En ce qui concerne l'inhibition des pathogènes en milieu de culture liquide, le NaCl et le KCl apparaissent avoir des effets similaires sur la croissance de *L. monocytogenes* (Bozianis *et al.*, 2007) et *S. aureus* (Bidlas et Lambert, 2008). Or, il est connu que la croissance de ces pathogènes est différente en fonction du type de milieu (Koutsoumanis *et al.*, 2004 ; Schwartzman *et al.*, 2010).

L'utilisation d'un ratio NaCl:KCl dans un Cheddar a réduit le risque de développement de *L. monocytogenes* et de *S. aureus*, permettant ainsi un meilleur contrôle au niveau de l'innocuité. En effet, pendant l'affinage de 70 jours à 7 °C d'un Cheddar salé à 2,5 %, la population de *L. monocytogenes* a diminué de 0,38 log dans un fromage avec NaCl seulement, par rapport à une réduction de 2,34 logs dans le fromage où un ratio NaCl:KCl était utilisé (Mehta et Tatini, 1992). À la fin d'un affinage de 56 jours d'un Cheddar inoculé avec *S. aureus*, la production de l'ES A par *S. aureus* n'était pas directement reliée au type de sel utilisé ou à la quantité ajoutée lors de la fabrication. De plus, la population de *S. aureus* était inférieure de 0,60 log dans le fromage salé avec le ratio NaCl:KCl comparativement à celui où seul du NaCl avait été utilisé. Ceci suggère donc un léger effet bactériostatique du KCl à l'égard de la croissance de *S. aureus* dans ce fromage (Koenig et Marth, 1982). Ces auteurs suggèrent que le mécanisme d'inhibition par le KCl soit relié au fait qu'une augmentation de la concentration extracellulaire de KCl pourrait causer une modification du gradient K⁺ dans la membrane

cellulaire bactérienne. Ainsi, la cellule aurait davantage besoin d'énergie pour établir le gradient transmembranaire de cet ion. La croissance du pathogène devient limitée et la sécurité microbiologique du fromage est améliorée.

1.5 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Problématique

Considérant les recommandations faites par Santé Canada et le rôle essentiel du NaCl dans la prévention de la croissance des pathogènes, l'impact qu'aura une réduction du sel sur l'innocuité microbienne des fromages, dont le Camembert, doit être déterminé. La préservation de l'innocuité microbienne d'un fromage se fait grâce à différentes barrières, telles l' a_w , le pH, la température et la flore compétitrice, qui ont un effet synergique entre elles. Considérant cela et sachant qu'il est connu que même une faible réduction de l'une de ces barrières peut avoir un grand impact sur la stabilité microbiologique d'un aliment, il devient nécessaire de vérifier l'impact de la réduction du sel et de son remplacement sur l'innocuité du Camembert.

Hypothèse

La cinétique de croissance de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* est influencée par la réduction du NaCl dans un Camembert, alors que l'utilisation du KCl permet de rétablir la barrière contre leur croissance.

Objectif général

Déterminer si, à l'égard de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*, l'innocuité actuelle du Camembert est compromise par des réductions en sodium ou par la substitution partielle du NaCl par du KCl.

Objectifs spécifiques

1. Caractériser et sélectionner des souches de *L. monocytogenes* et *S. aureus* récemment isolées de fromages québécois sur la base de leur résistance au sel et d'analyses moléculaires.
2. Déterminer la cinétique de croissance de *L. monocytogenes* dans un caillé modèle Camembert réduit en NaCl ou partiellement substitué par du KCl.
3. Déterminer la cinétique de croissance de *S. aureus* dans un caillé modèle Camembert réduit en NaCl ou partiellement substitué par du KCl.

Chapitre 2

Croissance de *Listeria monocytogenes* et
Staphylococcus aureus dans un fromage Camembert
modèle réduit en sodium ou
partiellement substitué par du KCl

Growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a Low-Sodium or Partially Substituted by KCl Camembert Cheese Model.

Valérie Goulet-Beaulieu, Marilyne Touchette, Britte Pauchet, Ismail Fliss et Steve Labrie*

Institute of nutrition and functional foods (INAF), STELA Dairy Research Centre, and Department of Food Sciences and Nutrition, Université Laval.

***Corresponding author.**

Département des Sciences des Aliments et de Nutrition, 2425 rue de l'Agriculture, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1V 0A6.

Telephone: (418) 656-2131 ext: 3243; Fax: (418) 656-3353

E-mail: steve.labrie@fsaa.ulaval.ca

Highlights:

- Salt tolerance is strain dependent in *L. monocytogenes* but not in *S. aureus*.
- 30% NaCl reduction affected *L. monocytogenes* growth at the soft cheese surface.
- KCl substitution limited slightly the growth of these pathogens in a soft cheese.
- NaCl is suggested to be a minor hurdle to the growth of pathogens in soft cheese.

Key-words: Mold-ripened cheese, Food safety, Low-Salt cheese, Sodium substitution, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*.

2.1 RÉSUMÉ

Des souches de *L. monocytogenes* et *S. aureus* ont été génotypées et étudiées en fonction de leur tolérance au NaCl. Leur cinétique de croissance a ensuite été étudiée dans des caillés modèles Camembert, soumis à différentes réductions en NaCl ou substitutions partielles du NaCl par du KCl. La tolérance au NaCl de *L. monocytogenes* est souche dépendante alors que celle de *S. aureus* ne l'est pas. Par rapport au caillé contrôle, la croissance de *L. monocytogenes* a été légèrement supérieure à la surface de celui réduit de 30 % alors qu'au centre, l'utilisation du KCl a permis une réduction de sa croissance. Les différentes conditions expérimentées ont permis la survie de *S. aureus* dans tous les caillés, mais de manière plus importante dans le contrôle. Néanmoins, il y a croissance des pathogènes en quantités inacceptables du point de vue de l'innocuité alimentaire. Cette étude suggère donc que le risque relié à la croissance de ces pathogènes dans un Camembert est peu influencé en fonction des conditions salines.

2.2 ABSTRACT

A high daily sodium intake is a health concern in many countries and different strategies were recently proposed to limit sodium consumption. One strategy was reducing sodium in processed food, including cheeses. However, sodium chloride (NaCl) has a recognized inhibitory effect on microorganisms' growth. Soft cheeses, like Camembert and Brie, are at risk for pathogen growth due to their composition (*i.e.*, high pH and a_w). Foodborne illness associated with halotolerant *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* is a major concern in these cheeses. The aim of this study was to determine if, with respect to the growth of these pathogens, the safety of soft cheese is compromised by various NaCl reductions likely to be applied at the manufacturing level. Strains recently isolated Canadian cheese production were typed and studied for their tolerance to NaCl. The majority of *L. monocytogenes* strains belonged to serotype 1/2a and demonstrated diverse behaviors in the presence of different NaCl concentrations. Three MLST sequence types were obtained for *S. aureus* isolates and, with one exception, all strains demonstrated similar behavior at all NaCl concentrations. Thereafter, three-strain cocktails were selected and used to spike soft-cheese model curds (SCMC) at 10^3 cfu/g for *L. monocytogenes* and 10^5 cfu/g for *S. aureus*. Control (unreduced), sodium net reductions of 15% and 30%, and NaCl equimolar substitutions by KCl of 15% and 30% were assayed in SCMC. Compared to the control SCMC, the growth of *L. monocytogenes* increased slightly at the surface of the 30% NaCl-reduced SCMC ($p = 0.0182$), while SCMC with KCl equimolar substitution allowed a low reduction of the growth in the center (15% KCl substitution, $p = 0.0014$; 30% KCl substitution, $p = 0.0013$). *S. aureus* survived in the SCMC center under all saline conditions but no significant differences were observed between the conditions ($p > 0.05$). At the surface, better survival occurred in the control compared to other salt conditions tested ($p < 0.05$). No staphylococcal enterotoxins were detected. Even when significant differences in microbial population of the pathogen were found, all conditions allowed bacterial growth to reach unacceptable levels in terms of food safety. Accordingly, this study suggests that NaCl is a minor hurdle to *L. monocytogenes* and *S. aureus* growth in soft cheeses.

2.3 INTRODUCTION

High daily sodium intake is a health concern in many countries around the world. For example, daily sodium intakes of 3098, 3380 and 3734 mg/day were reported in Canada, USA and United Kingdom recently (Fischer *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2011). Since 2007, the World Health Organization (WHO) has supported the development of national salt reduction strategies and recommends a daily sodium target of 1965 mg (WHO, 2007). All around the world, health agencies have introduced initiatives to reduce sodium consumption; on a voluntary basis, for most of them. In 2011, Webster *et al.* (2011) listed 32 countries engaged in salt reduction initiatives. The main motivation is that high salt consumption is an important risk factor for initiating or increasing high blood pressure, which is linked to cardiovascular disease (He and MacGregor, 2002; Karppanen and Mervaala, 2006; Stamler *et al.*, 1989; Whelton *et al.*, 2012).

Most strategies recommend reducing sodium in processed food, considered to be the major contributor in the modern diet (Santé Canada, 2012a; Webster *et al.*, 2011). However, NaCl plays many positive technological roles in processed food. One of which is to prevent growth of foodborne pathogens, especially in cheeses, where NaCl concentrations may vary between 0.15 and 6% (Donnelly, 2004; Doyle and Glass, 2010; Guinee and Fox, 2004; Guinee and O'Kennedy, 2007; Johnson *et al.*, 2009). Salt reduction could, therefore, potentially impact the microbiological safety of some foods. Soft cheeses are particularly sensitive to pathogenic contamination due to their intrinsic composition (pH gradient, high moisture and a_w) (Spinnler and Gripon, 2004). They offer a favorable growth environment for pathogens like *L. monocytogenes* and *S. aureus*, which compromises their microbiological safety (Health Canada and FDA, 2012; Spinnler and Gripon, 2004). Even if cheeses are made with pasteurized milk, post-pasteurization contamination with different pathogenic bacteria may occur and their counts significantly increase during the ripening period, when environmental conditions are favorable (Back *et al.*, 1993; Gaulin *et al.*, 2012; Genigeorgis *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2007; Ramsaran *et al.*, 1998; Ryser and Marth, 1987a, 1987b).

L. monocytogenes is an ubiquitous, psychrophilic and halotolerant pathogen able to grow at an optimal pH of 7.1 (Adams and Moss, 2008; Larpent, 2004). Foodborne illness associated with *L. monocytogenes* is a major concern in cheese and can be fatal (Donnelly, 2004; Wagner and McLauchlin, 2008). *L. monocytogenes* in cheese caused a serious outbreak in 2008 in the province of Québec (Canada) resulting in a total of 38 cases including five deaths (three were perinatal) (Gaulin *et al.*, 2012). *S. aureus* is a major, halotolerant food-borne pathogen, can grow in a medium containing up to 20% NaCl and at an optimal pH of 7.0 (Adams and Moss, 2008; Rode *et al.*, 2010). Normanno *et al.* (2005) reported that, in Italy during a 2-years period, 23.7% of 1578 cheese samples tested contained coagulase positive staphylococci.

Salt substitutes were proposed as an alternative to limit the NaCl content in cheese. Potassium chloride (KCl) appears to be the most interesting substitute, considering the minor organoleptic and textural changes it introduces to the cheese when it is used at appropriated concentrations (Fitzgerald and Buckley, 1985; Grummer *et al.*, 2012; Lindsay *et al.*, 1982; Reddy and Marth, 1993, 1995). NaCl substitutions up to 30% by KCl were reported to be possible in some cheese varieties but excessive KCl modifies the organoleptic properties, generating metallic off-flavours. In liquid medium, it has been shown that equimolar concentrations of NaCl and KCl have similar inhibitory effects on the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Bidlas and Lambert, 2008; Boziaris *et al.*, 2007). The behavior of these pathogens was also studied in Cheddar cheese reduced in sodium or substituted by KCl (Koenig and Marth, 1982; Mehta and Tatini, 1992).

Our aim was to investigate the influence of salt and salt substitution on the behaviour of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in soft cheese using the soft cheese model curd (SCMC).

2.4 MATERIALS ET METHODS

2.4.1 Bacterial strains

Nine *L. monocytogenes* and twelve *S. aureus* strains were obtained from the *Direction des laboratoires d'expertises et d'analyses alimentaires* of the *Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec* (MAPAQ), except for *S. aureus* LMA-1063. All strains are listed in Table 7. *L. monocytogenes* species identification was confirmed by API-Listeria (bioMérieux Canada, Montréal, Canada). *S. aureus* species affiliation was confirmed by sequencing the 16S ribosomal RNA gene (Becker *et al.*, 2004).

2.4.2 Culture conditions

Strains were stored at -80°C in TSBYE (Bacto™ Tryptic Soy Broth; BD Canada, Mississauga, Canada) containing 0.6% yeast extract (EMD, Darmstadt, Germany) and 30% (v/v) glycerol. Strains were subcultured twice overnight at 37°C in TSBYE before use, the first for 24 h and the second overnight, inoculated at 1% (v/v) in TSBYE as described by Daley *et al.* (1997).

Tableau 7. *L. monocytogenes* and *S. aureus* strains.

Strain number	Source	Isolation date	Characterization
LMA^a			
<i>Listeria monocytogenes</i>			Serotype
1042	Cheddar cheese curds	January 2008	1/2a
1043	Raw milk cheese	February 2008	1/2a
1044	Soft cheese	September 2008	1/2a
1045 ^b	Raw milk cheese handwork	September 2008	1/2a
1046	Pasteurized milk cheese	October 2008	- ^c
1047	Cheese	October 2008	1/2a
1049	Cheese	January 2009	1/2b
1050	Cheese	January 2009	1/2b
1051 ^b	Cheese	January 2009	1/2a
<i>Staphylococcus aureus</i>			Sequence type
1052	Raw milk cheese	October 2010	15
1053	Raw milk cheese	January 2011	352
1054	Cheese	November 2008	352
1055	Cheese	November 2008	352
1056	Cheese	November 2008	352
1057	Cheese	November 2008	352
1058	Cheese	November 2008	352
1059	Cheese	November 2008	352
1060	Cheese	November 2008	352
1061	Cheese	November 2008	352
1062	Cheese	November 2008	352
1063	Clinical isolate ATCC ^d 25923	N/A ^e	243

a: LMA: Laboratoire de Mycologie Alimentaire, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

b: Pulsotype 93: this strain was responsible of the 2008 outbreak in Québec province, Canada (Gaulin *et al.*, 2012).

c: Biochemically *L. monocytogenes*, serologically untypable.

d: ATCC: American Type Culture Collection.

e: N/A: Not Available.

2.4.3 *L. monocytogenes* serotyping

All *L. monocytogenes* strain serotypes were determined by the National Microbiology Laboratory (Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Canada) according to the method published by Seeliger and Höhne (1979). Briefly, antigenic characteristics of the strains were used to determine their immunological serotype. In the case of *Listeria* spp., 15 somatic and five flagellar antigens may be distinguished and their combination allows serotype assignment.

2.4.4 *S. aureus* genotyping using MLST

Genotyping using MLST was performed on all *S. aureus* strains according to the method of Enright *et al.* (2000), but the DNA extraction protocol was modified as follows. Briefly, cultures were grown as described in section 2.4.2 and washed twice using sterile 0.85% NaCl after centrifugation at 6000 g for 15 minutes at room temperature. The cell pellet was resuspended in 400 μ L of lysis solution containing 250 units/mL lysozyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 25 units/mL lysostaphin (Sigma-Aldrich), 10 mM EDTA, and 10 mM Tris in sterile water and was incubated for 15 minutes at 37°C. Subsequently, 50 μ L of 10% SDS was added followed by a 15 minutes incubation at 60°C. Then, 20 μ L of 20 mg/mL proteinase K (Life Technologies Inc., Burlington, Canada) was added and the suspension incubated an additional 20 minutes at 60°C. An equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) was added and the solution was mixed thoroughly using a vortex mixer and centrifuged for 15 minutes at 18 000 g. The aqueous phase was transferred to a new tube and extracted using an equal volume of chloroform after centrifugation at 18 000 g for 15 minutes. The aqueous phase was transferred to a new tube and 100 μ L of 7.5 M ammonium acetate and 1 mL of 95% ethanol kept at -20°C were added. After centrifugation at 18 000 g for 15 minutes, the pellet was washed with 500 μ L of 70% ethanol (-20°C) and centrifuged at 18 000 g for 15 minutes. The DNA pellet was dried for 10 minutes at 45°C using a vacuum concentrator (Vacufuge® plus; Eppendorf Canada, Mississauga, Canada) and resuspended in 30 μ L of sterile water containing 1 μ L of RNase A (20 mg/mL) (Life Technologies Inc.). The PCR amplification of all MLST loci was performed as described by Enright *et al.* (2000). The sequences obtained were edited and assembled into contigs using the *Staden Package* (Staden *et al.*, 2003). Sequence alignments and analysis were performed using *MEGA5* (Tamura *et al.*, 2011). Each locus was then compared with those in the MLST database for *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net/>) and allelic profile and sequence type (ST) were assigned.

2.4.5 Sodium chloride tolerance

All strains listed in Table 7 were inoculated separately into 96-well micro plates to obtain a final bacterial concentration of 10^6 cfu/ml, which represents the sodium chloride tolerance method's detection limit. Each well contained a total volume of 175 μ L, including 50 μ L of 10^6 cfu/mL cell culture and 125 μ L of TSBYE supplemented with the appropriate NaCl concentration from a 3.5 M sterile stock solution (Ribeiro *et al.*, 2006). *L. monocytogenes* sodium tolerance was experimented at 0.5, 2.00, 4.00, 5.00, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50 and 8.00% NaCl and at 0.5, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 9.00, 10.00, 12.00, 14.00 and 15.00% on *S. aureus*. The TSBYE broth intrinsically contains 0.5% NaCl, which was considered in all calculations. Growth was monitored by measuring the absorbance (650 nm) of each well at $t=0$ and $t=24$ h after incubation at 35°C without shaking, using a Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader (Thermo Scientific Limited, Nepean, Canada). Growth was quantified by calculating the absorbance difference between these two measures. The absorbance was measured in triplicate for each of three biological replicates.

2.4.6 SCMC production

Soft cheese model curd is an experimental model that is derived from real Camembert cheese produced under standard conditions except for salting and the addition of fungal ripening culture. The SCMC was previously demonstrated to mimic Camembert cheese but allow modulation of selected parameters such as water content, salt and the use of defined microbial cultures (Lessard *et al.*, 2012). The SCMC was then formulated to allow the best growing conditions for *L. monocytogenes* or *S. aureus* and still comply with the Canadian legislative standard for Camembert cheese. The experimental setup was selected to study the worst case scenario in order to evaluate only the impact of salt concentration. For this reason, humidity was set at 56% (the maximum permitted by Canadian law) and lactic acid starters were eradicated by irradiation to eliminate potential competition with the pathogens.

Soft cheese model curd was produced as described by Lessard *et al.* (2012) at the pilot scale with some modifications. Briefly, two 200 L Camembert cheese productions were performed, one batch per studied pathogen. Whole raw milk from the *Centre de recherche en sciences animales de Deschambault* was pasteurized (16 s at 75°C) and held at 32°C. The milk was then inoculated with 1% (v/v) Flora Danica (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) (Nichol, 1999) and 0.26 mL/L of a CaCl_2 solution (CalSol; 45% w/v) was added. When the milk reached pH 6.4, 0.1 mL/L of CHYMAX rennet (containing 520 mg/L of chymosin; Chr. Hansen) was added. Total coagulation time was 75 minutes (coagulation 25 minutes and firming 50 minutes) and the cheese curd was cut and shaped in moulds (diameter, 103 mm; height, 109 mm), which were inverted at 30, 60 and 180 minutes. The cheese curd rested overnight in the cheesemaking chamber at

22°C and was then crumbled by hand, lyophilized using a Virtis-Repp Freeze Dryer (SP Industries Inc., Pennsylvania, USA) and ground with a disc mill (type c/11/1; Glen Mills Inc., Clifton, USA). The resulting fine powder was gamma-irradiated (5 kGy) with a Cobalt-60 source using a Gammacell 220 Research Irradiator (Nordion, Ottawa, Canada). Curd powder at pH 4.69 was finally vacuum sealed in plastic bags and stored at -30°C until use.

2.4.7 Bacterial inoculum preparation

A standard curve was performed for each bacterial species to establish the relation between optical density at 650 nm (OD_{650nm}) and cell concentration in cfu/mL. Using this curve, each pre-culture was adjusted to 4.5×10^8 cfu/mL for *S. aureus* and 5.0×10^8 cfu/mL for *L. monocytogenes*. For the *L. monocytogenes* cocktail, a 3 mL aliquot of each of strains LMA-1042, LMA-1044 and LMA-1045 was collected, pelleted by centrifugation (6000 g, 15 min) and resuspended in 9 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5 (PBS) (Farkye *et al.*, 1995). The same procedure was undertaken for *S. aureus* using strains LMA-1052, LMA-1053 and LMA-1063. Appropriate dilutions of washed cells were prepared in PBS to achieve a final concentration of 10^3 or 10^5 cfu/g of SCMC for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively.

2.4.8 SCMC preparation and ripening conditions

Lyophilized and irradiated cheese curd powder was rehydrated in 450 g portions with sterile water (final moisture content of 56%) containing appropriate salt concentrations (NaCl and KCl) as represented in Table 8. The solution was also supplemented with 1 mL (Liu *et al.*, 2007) of appropriate pathogen inoculum and with ripening culture containing *Penicillium camemberti* (PCA1; Chr. Hansen), *Geotrichum candidum* (Geo17; Danisco Canada Inc., Scarborough, Canada) and *Kluyveromyces lactis* (KL71; Danisco Canada Inc., Scarborough, Canada) (Spinnler and Gripon, 2004). Before inoculation, each ripening culture was rehydrated overnight at 4°C in 0.1% (w/v) peptone water, according to the manufacturer's recommended procedure and dosage. At least three biological repetitions were performed for each saline condition.

Six 55 g portions were taken from the 450 g of rehydrated SCMC and placed in sterile wide mouth 250 mL glass jars (Bernardin; Jarden Branded Consumables, Richmond Hill, Canada). The jars were sealed with a white mould cheese paper (Amcor Kirkland, Kirkland, Canada) treated with ethanol 70%, incubated nine days at $14 \pm 1^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ relative humidity (RH) in a ripening chamber (Scientific incubator with humidity and temperature stability; Nor-Lake Inc., Hudson, USA) then held at 4°C until day 33.

Tableau 8. Saline conditions selected in soft cheese model curd.

Conditions	NaCl Reduction	KCl Substitution	% total salt(s) (w/w)	Ratio S/M ^b
Control	-0%	-	2.21 ^a	3.95
NaCl net reduction	-15%	-	1.87	3.34
	-30%	-	1.55	2.77
NaCl equimolar substitution with KCl	-15%	15%	2.30	4.10
	-30%	30%	2.39	4.27

a: Initial NaCl concentration was according Guizani *et al.* (2002).

b: Ratio Salt-to-Moisture.

2.4.9 SCMC sampling and analysis

Each SCMC was sampled at days 0, 5, 9, 14, 23 and 33. Analysis of SCMC included bacterial enumeration and pH measurement, both at the surface and the center of the SCMC. In addition, staphylococcal enterotoxin detection was performed for SCMC inoculated with *S. aureus* strains. The surface corresponds to the first 5 mm under the mycelium rind (Back *et al.*, 1993), which was removed by scraping with a sterile scalpel blade. The remaining paste, corresponding to the center zone, was cut in several small parts, mixed and sampled. The pH was measured in triplicate using an Orion 2-Star Benchtop pH Meter (Thermo Scientific) with a calibrated electrode (Probe pH spear tip; Sper Scientific, Scottsdale, USA).

2.4.10 Microbiological enumeration

L. monocytogenes and *S. aureus* were enumerated at each sampling day. Ten grams of curd (surface and center, separately) was added to 90 mL of sterile 2% sodium citrate at 45°C and stomached at 250 rpm for 2 minutes. Serial dilutions were prepared in 0.1% peptone water and spread on the appropriate agar plate medium, in triplicate. Modified Oxford medium (Oxford base; EMD) supplemented with ceftazidime (20 mg/L) (Anonymous, 2003), polymyxin B sulfate (10 mg/L) (replacing colistin sulphate) and acriflavine hydrochloride was used for *L. monocytogenes* enumeration. *S. aureus* was enumerated using Baird-Parker medium (EMD) with egg yolk tellurite (BD Canada) (Kim and Oh, 2010). Both microorganisms were incubated for 48 h at 35°C according to standard protocols (Government of Canada, 2005; 2011).

2.4.11 Staphylococcal enterotoxin detection in SCMC inoculated with *S. aureus*

Staphylococcal enterotoxin analysis was performed using Ridascreen® Staphylococcal Enterotoxin Total kit (R-biopharm, Darmstadt, Germany), an enzyme immunoassay for combined detection of *S. aureus* enterotoxins A, B, C, D and E in foods (Ostyn *et al.*, 2011). Two biological repetitions of the analysis were performed in triplicate on each 10 g SCMC sample (5 g surface and 5 g center) at day 33 for each condition presented in Table 8. Sample preparation was performed according the manufacturer's instructions for food with a fat content of less than 40%.

2.4.12 Experimental design and statistical analysis

A two-way repeated-measures ANOVA (salt condition and day of sampling) was used to compare the growth of pathogens and the pH measures in SCMC. At least three replicates of each experiment were conducted. Logarithmic transformation was used to satisfy the assumptions of the model (enumeration variables). For each model, structures of variance-covariance were compared and the one with the smallest value for the Akaike Information criteria corrected (AICC) was chosen. For SCMC inoculated with *L. monocytogenes*, a Spatial Power structure was used for the analysis of *surface* results, while *center* results were analyzed using a power of the mean structure. For SCMC inoculated with *S. aureus*, the two structures chosen were heterogeneous compound symmetry and first-order autoregressive. The degrees of freedom method of Kenward-Rogers was applied. Contrasts were used to determine the significant differences of means at $p < 0.05$ over all comparisons. Data points were expressed as mean \pm standard error. The analysis was performed using the MIXED procedure of SAS (version 9.2, SAS; Cary, USA).

2.5 RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1 Pathogenic strain characterization and selection

In order to select the strains to be assayed for their growth in SCMC, polyphasic characterization of nine *L. monocytogenes* and twelve *S. aureus* strains was performed. Strains were selected, partly, to reflect the diversity of the strains isolated from contaminated cheeses of Quebec during the years 2008-2011.

2.5.1.1 *L. monocytogenes* serotyping

Nine strains obtained from the Quebec provincial government laboratory were confirmed as *L. monocytogenes* using the API-Listeria protocol. The serotyping of all *L. monocytogenes* strains revealed that LMA-1049 and LMA-1050 belong to serotype 1/2b, LMA-1046 is serologically untypable and all other *L. monocytogenes* strains belong to serotype 1/2a (Table 7). The latter was already identified as the predominant serotype causing outbreaks in Canada from 1988 to 2010 (Knabel *et al.*, 2012). It is noteworthy to mention that strains LMA-1045 and LMA-1051 correspond to the pulsotype 93 that caused a major outbreak in cheeses in Canada in 2008 are typed as 1/2a (Gaulin *et al.*, 2012).

L. monocytogenes strains belonging to lineage I (serotypes 1/2b, 3c and 4b) are mainly associated with epidemic forms of human listeriosis while strains characterized by lineage II (serotypes 1/2a and 3a) are frequently isolated from food (Bergholz *et al.*, 2010; Wagner and McLauchlin, 2008). Among the strains studied, only LMA-1045 and LMA-1051 (serotype 1/2a, lineage II) were involved in foodborne disease, with 38 confirmed cases of human listeriosis (Gaulin *et al.*, 2012). The majority of *L. monocytogenes* strains in this study were serotyped 1/2a and were isolated from food (Table 7). Bergholz *et al.* (2010) noted that strains belonging to lineage II had an impaired ability to adapt to salt stress compared to those of other lineages, but that phenomenon was not observed within the strains we tested.

2.5.1.2 Determination of the sodium chloride tolerance of *L. monocytogenes*

The growth of all *L. monocytogenes* strains as a function of eight salt concentrations (0.50, 2.00, 4.00, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, and 8.00%) in TSBYE was studied (Fig. 8). Each strain grew at all NaCl with the optimum growth observed at 0.5% NaCl for all strains. The growth of LMA-1042 decreased rapidly between 0.5 and 2% NaCl but this strain was more tolerant when the NaCl concentration was greater than 2%. LMA-1043 had the highest growth at 4% NaCl and seemed stable between 6.5% and 7.0% NaCl, although the population decreased at 7.5% NaCl. The growth of LMA-1044 and LMA-1046 were the lowest compared to other strains. LMA-1045 and LMA-1051 were both affiliated to pulsotype 93, but despite their genetic similarity, they

exhibited different growth behaviour in the presence of 6.5% NaCl in TSBYE, where LMA-1051 grew better. Interestingly, each strain included in this study showed a different growth profile according to the presence of salt. This demonstrates that salt tolerance in *L. monocytogenes* is strain dependent and that a multi-strain cocktail approach is a good strategy to overcome this limitation (Santé Canada, 2012b).

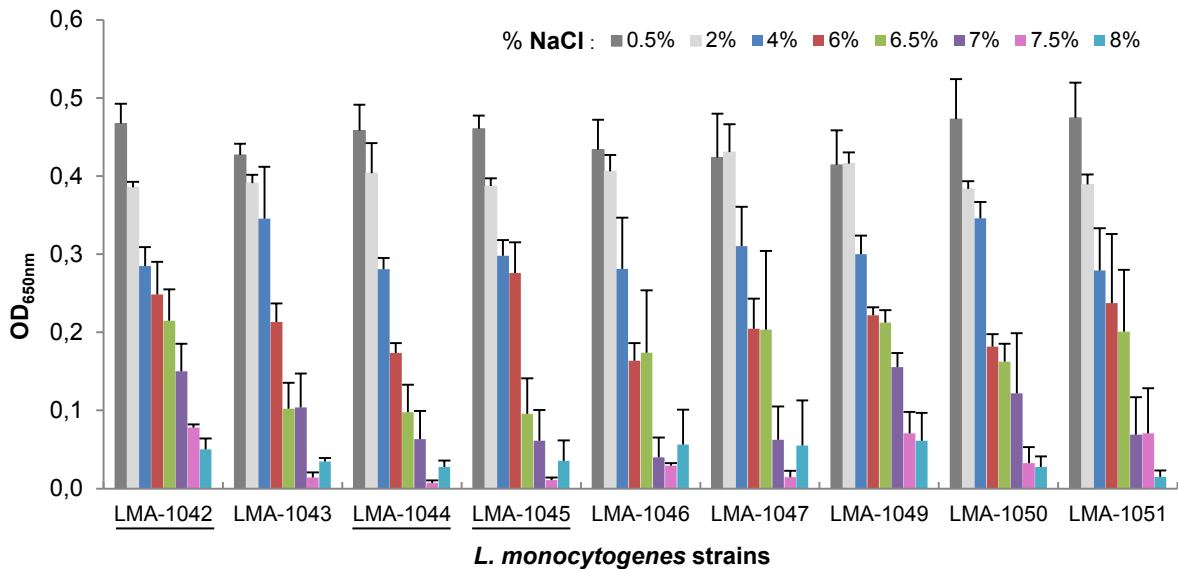


Figure 8. Influence of NaCl concentration on the growth (OD_{650nm}) of *L. monocytogenes* in TSBYE after 24 h at 35°C. Underlining indicates strains selected in the three-strain cocktail studied in SCMC.

Similar experiments supporting the findings of our study showed that the use of low NaCl concentrations in a culture medium improved the growth of *L. monocytogenes* while higher concentrations reduced cell survival (Bae *et al.*, 2012; Wagner and McLauchlin, 2008; Zaika and Fanelli, 2003). The duration of the *L. monocytogenes* lag phase was inversely proportional to the concentration of NaCl in the medium and the pathogen was able to grow in an environment containing up to 8% NaCl (Bereksi *et al.*, 2002; McClure *et al.*, 1991). Other authors have asserted that the growth of *L. monocytogenes* is possible up to 16% NaCl (Adams and Moss, 2008). *L. monocytogenes* is halotolerant due to osmoadaptation mechanisms that conserve cell membrane integrity by accumulating osmoprotectants such as glycine betaine, proline betaine, acetyl carnitine, carnitine, γ -butyrobetaine and 3-dimethylsulphonio propionate (Gandhi and Chikindas, 2007; Taormina, 2010).

2.5.1.3 *S. aureus* MLST

The phylogenetic affiliation was confirmed for all isolates presumptively identified as *S. aureus* by sequencing the 16S ribosomal RNA gene. All sequences obtained shared $\geq 99\%$ identity with reference sequences in

GenBank. Subsequently, the genotypes of *S. aureus* strains were determined using MLST to discriminate between the isolates. The sequences of *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* and *yqiL* loci were determined for all *S. aureus* isolates and their allelic profiles and sequence types (ST) are presented in Table 9.

Tableau 9. *S. aureus* allelic profiles and sequence types.

Strains LMA-	ST	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>
1052	15	13	13	1	1	12	11	13
1053	352	3	78	1	1	1	5	3
1054		3	78	1	1	1	5	3
1055		3	78	1	1	1	5	3
1056		3	78	1	1	1	5	3
1057		3	78	1	1	1	5	3
1058		3	78	1	1	1	5	3
1059		3	78	1	1	1	5	3
1060		3	78	1	1	1	5	3
1061		3	78	1	1	1	5	3
1062		3	78	1	1	1	5	3
1063	243	2	2	5	2	6	3	2

The twelve *S. aureus* strains were regrouped into three different ST. Two ST are each represented by a unique strain (ST15 and ST243), while ST352 contains ten isolates. Interestingly, isolates LMA-1054 to 1062 showed the same sensitivity to bacteriophages (El Haddad and Moineau, 2010). Altogether, this information indicates a low phylogenetic diversity within the isolates obtained from contaminated cheeses for this study.

2.5.1.4 Determination of the sodium chloride tolerance of *S. aureus*

In order to determine the salt tolerance of *S. aureus* strains, their growth was studied by turbidimetry in TSBYE medium using ten different NaCl concentrations: 0.50, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 9.00, 10.00, 12.00, 14.00 and 15.00% (Fig. 9). NaCl concentrations of 0.5% and 2% offer the best growth conditions for all strains and, with one exception (LMA-1063), all strains were inhibited at more than 15% NaCl. The growth profile of isolates belonging to ST352 was similar for all NaCl concentrations tested. It is generally reported that some strains of *S. aureus* can grow in liquid medium containing up to 20% NaCl (Adams and Moss, 2008).

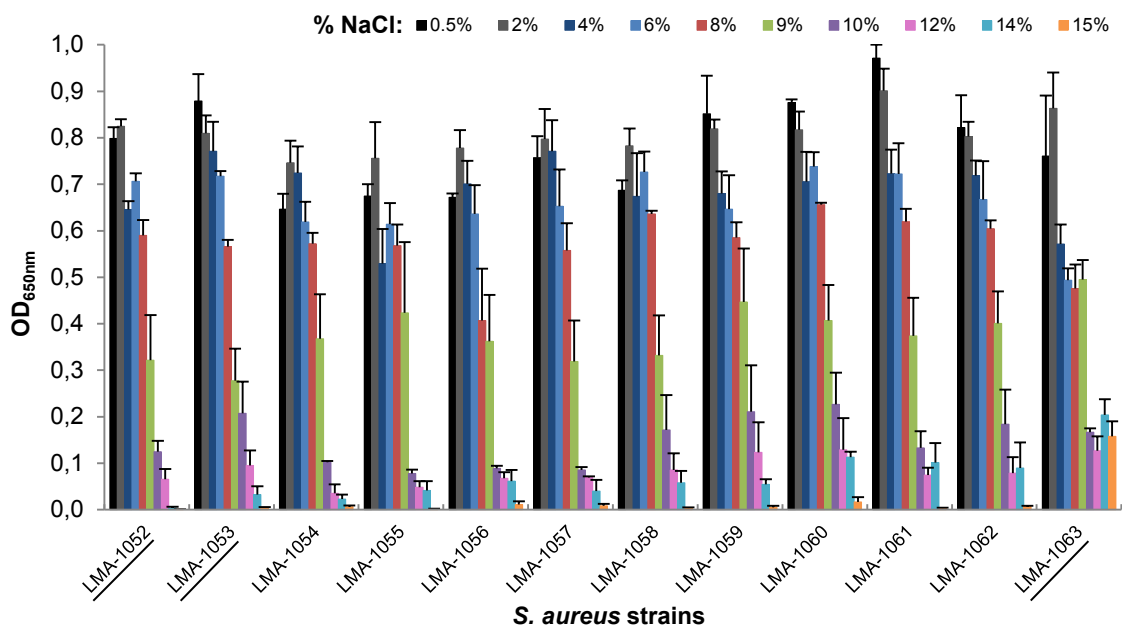


Figure 9. Influence of NaCl concentration on the growth (OD_{650nm}) of *S. aureus* strains in TSBYE after 24 h at 35°C. Underlining indicates strains selected in the three-strain cocktail studied in SCMC.

In agreement with other studies in liquid medium, an increase in NaCl concentration at a constant incubation temperature results in a decrease in the growth rate of *S. aureus* (Medvedová *et al.*, 2009; Sutherland *et al.*, 1994). When the NaCl concentration in liquid media was increased, the length of the latent phase was also increased, except for the highest concentration (18.17%) where the latent phase decreased (Medvedová *et al.*, 2009). Conversely, 5% NaCl in media may stimulate the growth of this bacterium (Hajmeer *et al.*, 2006). The halotolerance of *S. aureus* results from an accumulation of osmoprotectants which conserve the integrity of its cell membrane, similar to *L. monocytogenes* with addition of choline and taurine (Hajmeer *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 1991). Indeed, *S. aureus* can increase its intracellular concentration of proline 21-fold three minutes after exposure to a high NaCl concentration (Townsend and Wilkinson, 1992).

2.5.1.5 Strains selected for study in SCMC

Strains selected for subsequent experiments in SCMC were chosen according to their salt tolerance (Table 10). With respect to the salt content, the previous experiments demonstrated that the growth of *L. monocytogenes* at different NaCl concentrations was strain dependent while that of *S. aureus* was not. Consequently, *S. aureus* strains were selected according to their ST. *L. monocytogenes* strains belonging to serotype 1/2a were chosen according to their respective salt tolerance.

Tableau 10. Selected strains for SCMC study.

Species	Strains LMA-	Characteristics
<i>L. monocytogenes</i> serotype 1/2a	1042	Highest tolerance to NaCl
	1044	Lowest tolerance to NaCl
	1045	Associated with the 2008 outbreak in Québec, Canada
<i>S. aureus</i>	1052	Sequence Type 15
	1053	Sequence Type 352
	1063	Sequence Type 243

2.5.2 Analysis of SCMC ripening

2.5.2.1 pH measurement

In soft cheeses, a pH gradient develops during the ripening period due to the activity of mold ripening cultures located at the surface. The change in pH of the SCMC was monitored on each day of sampling (Fig. 10) to ensure that the gradient was similar under all conditions and properly controlled, regardless of the salt content. Moreover, the pH alkalisation profile was followed in a SCMC without pathogen inoculation to confirm that the pH gradients obtained were similar for the two SCMC batches.

Under different saline conditions the initial pH (day 0) of SCMC inoculated with *L. monocytogenes* and *S. aureus* varied between 4.75 ± 0.06 to 4.82 ± 0.01 and 4.73 ± 0.01 to 4.79 ± 0.04 , respectively. This is consistent with the work of Leclercq-Perlat *et al.* (2004), who obtained an initial pH of 4.7 ± 0.1 , and Guizani *et al.* (2002) who, at day 1, obtained a pH of 4.81 ± 0.09 at the surface and 4.76 ± 0.10 at the center. A rapid increase in pH occurred between day 5 and day 9 (Fig. 10) which is the result of the active growth of *P. camemberti* and *G. candidum* (Lessard *et al.*, 2012). The alkalisation profile at the surface and the center of the SCMCs without pathogen inoculation was slightly slower for the SCMC batch used to study *S. aureus* compared to the one used for *L. monocytogenes*. However, the alkalisation profiles in the SCMC inoculated

with *L. monocytogenes* were independent of the salt content ($p > 0.05$), both at the surface and in the center. The same observation could be made at the surface of the curd inoculated with *S. aureus*. Nevertheless, at the center of this curd, the control was significantly different from the equimolar substitution of 15% ($p = 0.0107$) and the equimolar substitution of 30% ($p = 0.0383$). The difference observed was limited to 0.24 pH units in both cases.

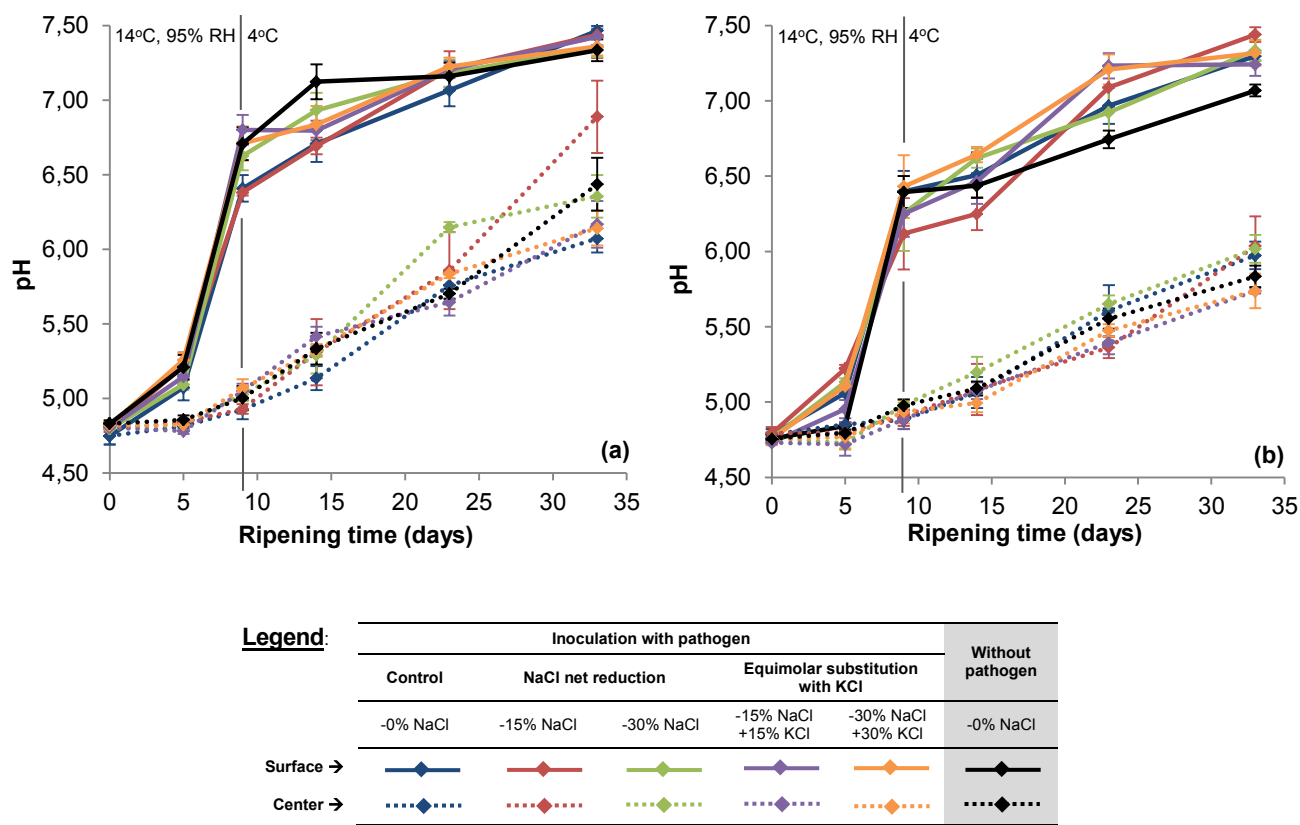


Figure 10. Evolution of pH at the surface and center of a SCMC under different saline conditions. The SCMC was inoculated with (a) *L. monocytogenes* LMA-1042, LMA-1044 and LMA-1045 (1:1:1) and (b) *S. aureus* LMA-1052, LMA-1053 and LMA-1063 (1:1:1) incubated over 33 days of ripening. Ripening conditions were 14°C, 95% RH during the first 9 days then SCMC were transferred to 4°C. The terms -0% refer to unreduced cheeses and -15% and -30% to sodium reduced cheeses.

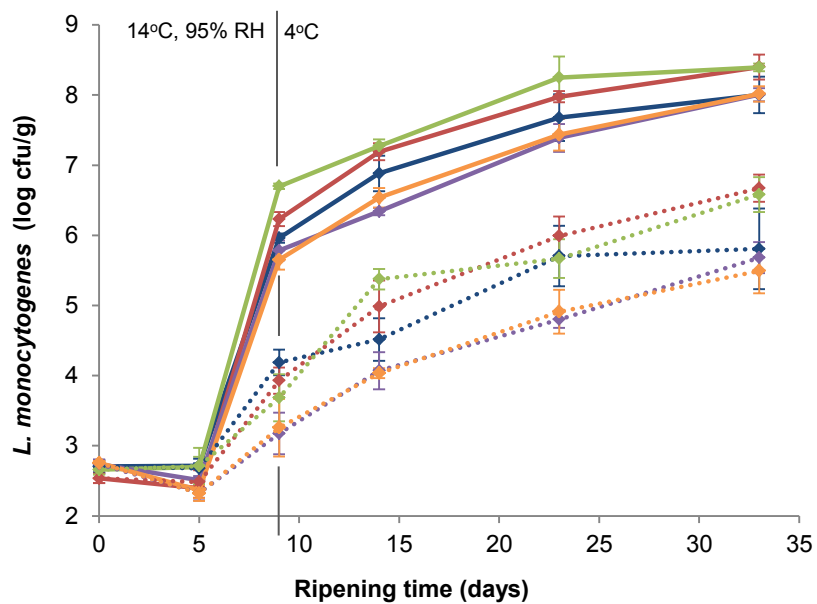
2.5.2.2 Behavior of *L. monocytogenes* and *S. aureus* during SCMC ripening

The growth profiles of *L. monocytogenes* and *S. aureus* were established in SCMC to determine the impact of a net reduction of the NaCl content and of its partial substitution. These experiments were performed under the conditions of "the worst case scenario", *i.e.*, the highest water content allowed by Canadian legislation and the absence of interacting lactic acid microflora. Therefore, the growth profiles obtained are likely to correspond to the fastest growth in most mold-ripened cheeses because other microbial hurdles might prevent pathogens

proliferation in industrial cheeses. This is particularly true in some cheese varieties where the lowest NaCl treatments generally support higher concentrations of lactic acid bacteria, which are helpful in limiting the growth of pathogens (Ryser and Marth, 1987a; Schroeder *et al.*, 1988). Therefore, the selected approach allows the analysis of the sole influence of the salt content parameter.

The growth profiles of *L. monocytogenes* (Fig. 11) and *S. aureus* (Fig. 12) were studied in SCMC using different saline conditions over 33 days of ripening. *L. monocytogenes* was intended to be inoculated at 10^3 cfu/g (Mehta and Tatini, 1992) but initial experimental concentrations ranging between 2.54 to 2.75 log cfu/g were obtained. Relative to *S. aureus*, because a decrease of the population was observed in pre-test, an inoculation level of 10^5 cfu/g was used.

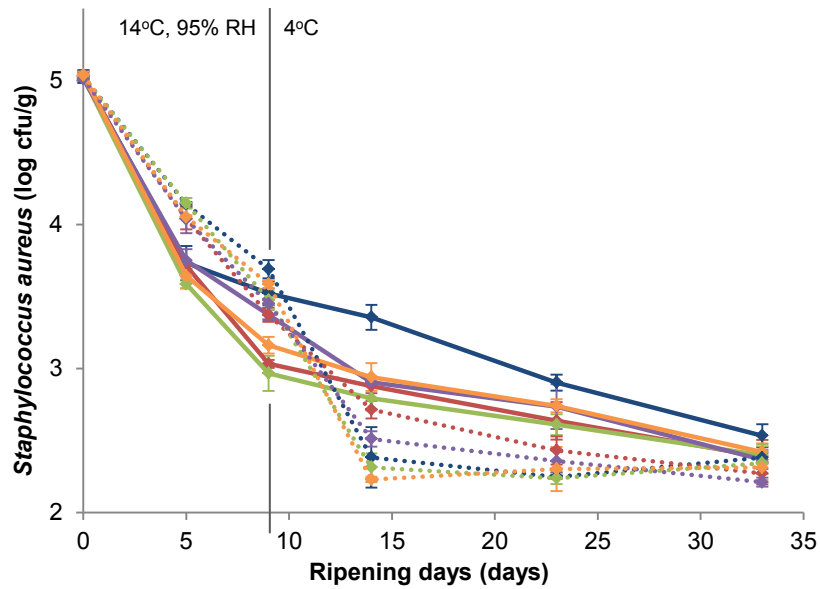
In the control curd without NaCl reduction (-0%), the number of *L. monocytogenes* was stable or decreased slightly until day 5 (Fig. 11). Rapid growth was observed between days 5 and 9, which correlated with the pH increase, particularly at the surface where the cell number increased by about 3 to 3.5 logs. The growth observed for *L. monocytogenes* in SCMC without salt reduction was observed in other studies (Back *et al.*, 1993; Genigeorgis *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2007; Ramsaran *et al.*, 1998; Ryser and Marth, 1987b). *L. monocytogenes* is a psychrophilic bacterium that has the ability to grow at low as 0.5°C while *S. aureus* was reported to grow at 7°C (Adams and Moss, 2008). Results from our study showed a different behavior of *S. aureus*. From day 0 to day 33, a rapid decrease ranging from 2 to 2.5 logs of the population of *S. aureus* (Fig. 12) was observed both at the center and the surface for all saline conditions tested. For a similar inoculum, other studies have also observed that the *S. aureus* population remained stable or declined slowly over the entire ripening period in a Camembert-type cheese made from raw goat's milk (Meyrand *et al.* (1998) and in a raw goat's milk lactic cheese (Vernozy-Rozand *et al.*, 1998). Necedová *et al.* (2009) demonstrated that *S. aureus* could grow slowly in a soft cheese at refrigeration temperature, however, the ripening conditions used (no RH, ripening temperature at 4 or 8°C from day 0) were different. We attempted to detect staphylococcal enterotoxin at day 33 for all saline conditions tested but no positive results were obtained.



Legend:

	Inoculation with pathogen				
	Control	NaCl net reduction		Equimolar substitution with KCl	
	-0% NaCl	-15% NaCl	-30% NaCl	-15% NaCl +15% KCl	-30% NaCl +30% KCl
Surface →	—◆—	—◆—	—◆—	—◆—	—◆—
Center →	...◆...	...◆...	...◆...	...◆...	...◆...

Figure 11. Growth of *L. monocytogenes* LMA-1042, LMA-1044 and LMA-1045 (1:1:1) at the surface and center of a SCMC under varied saline conditions over 33 days of ripening. Ripening conditions were 14°C with 95% RH during first 9 days then SCMC were transferred to 4°C. The terms -0% refer to unreduced cheeses and -15% and -30% to sodium reduced cheeses.



Legend:

	Inoculation with pathogen				
	Control	NaCl net reduction		Equimolar substitution with KCl	
	-0% NaCl	-15% NaCl	-30% NaCl	-15% NaCl +15% KCl	-30% NaCl +30% KCl
Surface →	—◆—	—◆—	—◆—	—◆—	—◆—
Center →	...◆...	...◆...	...◆...	...◆...	...◆...

Figure 12. Survival of *S. aureus* LMA-1052, LMA-1053 and LMA-1063 (1:1:1) at the surface and center of a SCMC under varied saline conditions over 33 days of ripening. Ripening conditions were 14°C with 95% relative humidity during first 9 days then SCMC were transferred to 4°C. The terms -0% refer to unreduced cheeses and -15% and -30% to sodium reduced cheeses.

2.5.2.2.1 NaCl net reduction

NaCl net reductions of 15% and 30% in SCMC were tested to determine their impact on the growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The survival of *S. aureus* in the center of SCMC was not affected by a NaCl net reduction ($p > 0.05$). At the surface, the concentration of *S. aureus* in SCMC decreased in 15% and 30% NaCl reductions by a mean of 0.23 ($p = 0.0037$) and 0.28 log cfu/g ($p = 0.0008$), respectively, compared to the control (Fig. 12). Koenig and Marth (1982) observed a higher *S. aureus* population decline in a Cheddar reduced in NaCl (-50%) when compared to unreduced control cheese. However, further investigation of the NaCl concentration effect, possibly linked with the presence of ripening culture, must be done to gain a better understanding of this phenomenon.

When comparing the control SCMC (-0% NaCl) to SCMC reduced in NaCl (-15% and -30%), the growth profiles of *L. monocytogenes* were similar, except at the surface when a 30% reduction ($p = 0.0182$) was applied. At the surface, the 30% reduction had a slightly higher number of *L. monocytogenes* by a mean difference of 0.36 log ($p = 0.0182$). These results differ from those obtained in Cheddar where NaCl net reduction, compared to control, resulted in lower (-52% NaCl) (Mehta and Tatini, 1992) or similar growth of *L. monocytogenes* (-38.8% NaCl) (Shrestha *et al.*, 2011). This difference could be easily explained by the absence of the starter culture in SCMC and the difference in the pH of these two models. NaCl reductions in natural cheeses promote an increase in the starter concentration (Schroeder *et al.*, 1988) and activity (lactic acid production), which is detrimental for the growth of *L. monocytogenes* (Ryser and Marth, 1987a; Young and Foegeding, 1993). Here the absence of starter culture helped to minimize the contribution of the NaCl hurdle for the control of this pathogen and revealed a minor inhibitory effect within the ranges usually selected for cheese manufacture.

2.5.2.2.2 NaCl equimolar substitution by KCl

Equimolar substitutions of 15% and 30% NaCl by KCl in SCMC were tested to verify their impact on the growth of *L. monocytogenes* (Fig. 11) and *S. aureus* (Fig. 12). Partial substitution by KCl had no impact on the survival of *S. aureus* at the center of the SCMC with equimolar substitutions ($p > 0.05$) while at the surface, the survival of this bacterium was slightly but significantly affected. Compared to the SCMC control, we observed a mean decrease of 0.16 log cfu/g ($p = 0.0365$) for a 15% equimolar substitution and a mean decrease of 0.19 log cfu/g ($p = 0.0133$) for a 30% equimolar substitution. Likewise, partial substitutions with KCl induced a slight decrease in the *L. monocytogenes* population, which was statistically different at the center ($p < 0.05$). The mean decrease of *L. monocytogenes* growth was 0.48 log cfu/g ($p = 0.0014$) for 15% equimolar substitution and 0.49 log cfu/g ($p = 0.0013$) for 30% equimolar substitution at this location. A similar trend

was observed for *L. monocytogenes* after 70 days of ripening in Cheddar cheese containing 2.5% salt composed of an equimolar mixture of NaCl and KCl (Mehta and Tatini, 1992). These authors observed a reduction of 0.38 log of the growth of *L. monocytogenes* in the case of Cheddar salted with only NaCl whereas this variation was 2.34 logs for the Cheddar with an equimolar mixture of NaCl and KCl. In the case of both pathogens, our results suggest that partial KCl substitution could have a small but very limited protective effect in Camembert toward *L. monocytogenes* growth and *S. aureus* survival. A similar phenomenon has been reported in a Cheddar for the growth of *S. aureus* (Koenig and Marth, 1982) and *Clostridium perfringens* (Bartsch and Walker, 1982). The KCl inhibition mechanism proposed by Koenig and Marth (1982) suggests that the increased extracellular KCl concentration could cause a modification in the K⁺ gradient in the bacterial cell membrane. Therefore, the cell must spend more energy to establish the transmembrane gradient of this ion.

2.5.2.3 Conclusion

From an industrial point of view, even if significant differences were detected in *L. monocytogenes* and *S. aureus* behavior in SCMC, these differences were quite minor. Indeed, the variations between the control curd and all NaCl reductions or substitutions were less than one log. The growth of *L. monocytogenes* is slightly decreased when NaCl equimolar substitution by KCl is performed but these conditions are still comparable in terms of risk for human health. This implies that the risk level for all conditions remains globally the same. All these conclusions are in agreement with Shrestha *et al.* (2011) who reported similar results in Cheddar cheese. This study suggests that NaCl is a hurdle of limited importance in soft-cheese for the growth of those two bacteria. Others hurdles as pH, temperature, humidity or synergy/competition with molds could be more effective to limit their growth in soft-cheese. Studies considering these hurdles need to be conducted in future works.

Acknowledgments

This project was supported by grants from the Canadian Dairy Research Cluster (Dairy Farmers of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada, Canadian Dairy Commission) and from the *Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies* (FRQNT). The authors are grateful to Morganne Jerome for her helpful contribution for the *L. monocytogenes* serotyping, to Anne-Sophie Julien for the statistical analysis, and to the MAPAQ for providing the pathogen strains. We are grateful to Dr. Sylvain Moineau for providing *S. aureus* strains LMA-1054 to LMA-1063. The authors also thank Dr. Barb Conway for her assistance in editing the manuscript.

Chapitre 3

Discussion générale, conclusion et perspectives

3.1 DISCUSSION GÉNÉRALE

La consommation du sodium est trop élevée chez la population de plusieurs pays à travers le monde et peut initier des pathologies liées à l'hypertension artérielle (IOM, 2013; Karppanen et Mervaala, 2006; WHO, 2013). La réduction du sodium dans les aliments apparaît donc comme un enjeu important. Au Canada, cela se traduit notamment par la mise en place d'une stratégie élaborée par différents experts en collaboration avec Santé Canada (Santé Canada, 2012 ; Webster *et al.*, 2011). Dans cette stratégie de réduction du sodium dans les aliments, deux recommandations (sur un total de 27) touchent plus spécifiquement le présent projet de maîtrise. D'abord, il est suggéré aux industries alimentaires de réduire la teneur en sodium dans leurs produits transformés (recommandation 1-3). Il est également recommandé d'affecter davantage de ressources afin de faire progresser la recherche sur la réduction du sodium (recommandation 3-1) (Santé Canada, 2010a). Des cibles de réduction volontaires du sodium pour une grande variété d'aliments ont aussi été suggérées aux industriels (Santé Canada, 2012). Plus récemment, à la suite d'un sondage effectué en 2011, une web émission (AAC, 2012) et un rapport (AAC, 2013) détaillant les efforts entrepris par les industriels ont été diffusés. Ces documents permettent de prendre connaissance des progrès ainsi que des difficultés rencontrées par les industriels dans leur démarche de réduction du sodium.

Bien que la réduction du sodium dans les aliments transformés soit proposée sur une base volontaire, elle suscite des questionnements importants étant donné les rôles essentiels de cet élément dans les aliments, spécialement à l'égard de la protection contre la croissance de microorganismes pathogènes. Il a été reconnu par les industriels que la réduction du sel était plus difficile à effectuer dans les aliments dont la reformulation impliquait un risque lié à leur innocuité, comme dans le cas des fromages (AAC, 2012). Parmi les défis relatifs à la réduction du sodium soulevés par les industriels, l'innocuité et le manque de recherche sur le sujet ont été cités. En effet, la recherche sur l'innocuité microbienne dans les aliments faibles en sodium a été nommée au deuxième rang des besoins d'assistance de l'industrie alimentaire (AAC, 2012). Conséquemment, il apparaît que la réduction du sodium dans le fromage, tout en assurant son innocuité, soit un défi de taille pour plusieurs industriels.

La revue de la littérature effectuée dans le cadre de ce mémoire a démontré que l'impact d'une réduction du sodium dans les fromages sur la croissance de bactéries pathogènes telles *S. aureus* et *L. monocytogenes* était peu documenté. Plus spécifiquement, aucune étude n'avait vérifié l'impact de la réduction en sel sur la croissance de ces pathogènes dans le Camembert. Il est ainsi difficile de déterminer théoriquement le risque relatif à cette réduction et il devient prioritaire de le comprendre afin d'assurer l'innocuité des fromages réduits en sodium, dont certains particulièrement à risque comme ceux à pâtes molles. Également, l'utilisation de sel

de remplacement comme le KCl est une alternative intéressante à la réduction nette du NaCl et peu d'informations sont disponibles au sujet de son impact sur la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*.

Le sondage effectué par AAC (2012, 2013) a révélé que des inquiétudes étaient présentes chez les industriels alimentaires, dont des transformateurs fromagers, à savoir si la réduction du sodium dans leurs produits pouvait compromettre l'innocuité. Les résultats découlant des travaux effectués dans le cadre de ce projet ont permis de répondre à cette crainte en déterminant l'importance de la barrière du sel à l'égard de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus* dans les fromages à pâtes molles. En effet, le risque relatif lié à la croissance de ces deux pathogènes, n'augmente pas dans ces fromages lors de réductions nettes de 15 et 30 % en NaCl. Une réduction de la teneur en sodium à 670 mg Na / 100 g pour le fromage Camembert, telle que proposée par le gouvernement canadien, paraît conséquemment une cible atteignable d'ici 2016 du point de vue de l'innocuité. Cependant, l'impact technologique de cette réduction au niveau de la croissance des ferments d'affinage, des propriétés organoleptiques et des caractéristiques physico-chimiques restent à établir.

La réduction nette en NaCl a été l'une des deux approches étudiées dans ce projet de recherche afin de limiter l'apport en sodium dans l'alimentation des Canadiens. La seconde approche étudiée était la substitution partielle du NaCl par du KCl. Cette dernière concorde également avec le sondage réalisé par AAC qui a démontré que 74 % des industries alimentaires sondées ont évalué la possibilité d'avoir recours aux substituts de sel afin de réduire la teneur en sodium dans leurs produits, mais que des contraintes au niveau de la réglementation les en empêchaient (AAC, 2012). Par exemple, certains additifs approuvés pour des usages multiples aux États-Unis ne le sont toujours pas au Canada, ou de manière très restreinte. Le KCl est approuvé aux États-Unis depuis 1983 et ce, sans grande limitation hormis l'utilisation des bonnes pratiques manufacturières (FDA, 2012). Bien que le KCl ait été le sel de remplacement le plus souvent cité par les industriels comme substitut potentiel, il n'est pas autorisé par la loi canadienne comme un additif alimentaire à des fins de substitutions du sel (AAC, 2012; Santé Canada, 2006). L'article rédigé dans le cadre de ce projet de maîtrise met en lumière qu'une substitution du NaCl par 15 et 30 % de KCl dans un caillé modèle Camembert permettait une légère inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*. Conséquemment, le KCl paraît être un substitut prometteur pour permettre la réduction du NaCl sans augmentation du risque relatif à l'innocuité microbienne, l'améliorant même légèrement. Par ailleurs, Santé Canada a récemment annoncé une nouvelle approche quant à l'accélération du processus d'approbation des additifs alimentaires. En effet, à la suite de la modification de la législation, l'organisation a déjà approuvé l'augmentation du niveau maximal pouvant être ajouté dans certains types de fromages de trois additifs (acide sorbique, sorbate de potassium et sorbate de calcium) (AAC, 2012). Ainsi, via ce processus amélioré et

accélééré, le KCl pourrait aussi être soumis à une approbation future en tant qu'additif alimentaire à utiliser à des fins de substitutions du NaCl.

Finalement, une réduction efficace de la consommation du sodium chez les Canadiens devra nécessairement intégrer une démarche de sensibilisation et d'éducation du consommateur. Qu'il s'agisse d'une réduction nette du NaCl ou de l'utilisation d'un sel de remplacement comme le KCl, le consommateur devra être informé, et convaincu, du bien-fondé de cette approche. Un moyen efficace d'y parvenir pourrait notamment être l'utilisation d'une allégation santé sur l'étiquette de l'aliment ; par exemple : « *Une alimentation saine comprenant des aliments à teneur élevée en potassium et pauvres en sodium peut réduire le risque d'hypertension, un facteur de risque d'accidents cérébrovasculaires et de maladies du cœur. (Nom de l'aliment) est une bonne source de potassium et est pauvre en sodium.* » (Santé Canada, 2012).

3.2 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce projet de recherche était d'étudier l'impact d'une réduction en sodium ou d'une substitution partielle du NaCl par du KCl sur l'innocuité du fromage Camembert, via l'étude de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus* dans ce fromage.

À la lumière des faits énoncés et démontrés dans ce mémoire de maîtrise, l'hypothèse posée en introduction est confirmée par les résultats obtenus aux objectifs 2 et 3. Une réduction de la teneur en sodium dans le Camembert a effectivement influencé la cinétique de croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*, bien que très modestement et de manière peu significative d'un point de vue microbiologique. Ceci suggère donc que la barrière du sel dans un Camembert ne soit pas aussi importante que présumée au début de l'étude. Le risque relatif lié à une modification de l'innocuité microbiologique dans ce type de fromage n'est donc pas influencé de manière significative par une réduction du sodium. De plus, la substitution partielle du NaCl par du KCl a effectivement rétabli la barrière du sel dans le fromage Camembert à l'égard de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus*, permettant ainsi une modeste inhibition de leur croissance et une légère réduction du risque sanitaire.

La réduction du sodium dans les aliments offre plusieurs opportunités d'innovations au sein de l'industrie alimentaire. En effet, en plus de permettre l'avancement des connaissances dans les domaines de la transformation et de la microbiologie alimentaires, ce projet ouvre la voie à plusieurs perspectives de recherche futures. Les impacts sur le Cheddar sont bien documentés et ceux sur le Camembert le sont davantage maintenant, grâce aux travaux réalisés dans le cadre du présent projet. En complément, il serait intéressant d'étudier l'impact d'une réduction en sodium sur la croissance de ces pathogènes dans d'autres types de matrice fromagère ; par exemple des pâtes persillées ou encore des pâtes fraîches, comme la ricotta ou le cottage.

Il a aussi été observé que le remplacement partiel du NaCl par du KCl permettait une légère inhibition de la croissance de *S. aureus* et *L. monocytogenes* en caillé modèle Camembert. Bien que certaines hypothèses aient été posées afin d'expliquer le phénomène, il serait pertinent, d'un point de vue plus fondamental, de comprendre le mode d'action exact de cette inhibition. Une fois le mécanisme étudié, compris et démontré, il s'agirait d'un argument de taille afin de modifier la législation concernant l'utilisation du KCl comme substitut au NaCl dans les fromages.

Deux des quatre bactéries pathogènes fréquemment retrouvées en industrie fromagère, toutes deux à Gram positif, ont été étudiées dans le cadre de ce projet. Il conviendrait de poursuivre ces travaux en s'attardant à l'impact d'une réduction du sodium sur la croissance des deux autres espèces bactériennes du groupe, *E. coli* et *Salmonella*, toutes deux à Gram négatif. Ceci permettrait de vérifier si leur physiologie différente a un impact sur leur développement en matrice fromagère. Également, la réduction du sodium pourrait favoriser la croissance d'autres bactéries pathogènes ou d'altération qui ne sont pas problématiques en ce moment avec les taux de sel utilisés. L'impact d'une réduction en sodium sur ce type de bactérie pourrait aussi être pertinent à étudier. Enfin, le présent travail s'est attardé uniquement sur la barrière du sel dans le fromage. Sachant que le fromage est un aliment complexe dans lequel plusieurs barrières agissent en synergie, il serait pertinent de considérer ce phénomène dans un travail futur. Par exemple, une étude pourrait porter sur l'impact de la modification de la barrière du sel en parallèle avec la variation d'autres barrières importantes dans le fromage, notamment celles du pH ou de l'humidité relative de l'environnement d'affinage. Sachant aussi que la présence de bactéries lactiques permet de freiner la prolifération de certaines bactéries pathogènes, il pourrait être approprié de vérifier dans quelle mesure ce phénomène est limitant.

Finalement, bien que le présent travail ait démontré que l'impact de la réduction du sodium était mineur à l'égard de la croissance de *L. monocytogenes* et *S. aureus* dans un Camembert, il reste néanmoins important qu'aucune contamination post-pasteurisation n'ait lieu. La gestion de la qualité à tous les niveaux de la chaîne de transformation est primordiale. L'établissement de procédures reconnues telles que les systèmes HACCP ou GFSI sont souhaitables pour les industriels. Celles-ci requièrent toutefois une quantité de main d'œuvre importante et engendrent des frais élevés. Elles sont donc très difficiles à mettre en place pour des petits transformateurs fromagers. Ces derniers peuvent toutefois se tourner vers l'utilisation de bonnes pratiques de fabrication. Il s'agit d'une alternative plus abordable qui leur permettra de réduire considérablement les risques sanitaires inhérents à la transformation fromagère.

Bibliographie

AAC, 2012. Agriculture et Agroalimentaire Canada : La réduction du sodium au Canada : progrès et défis. Diffusé le 03 octobre 2012.

AAC, 2013. Agriculture et Agroalimentaire Canada : Les efforts de réduction du sodium entrepris par l'industrie alimentaire canadienne [En ligne]. URL: http://www5.agr.gc.ca/resources/prod/doc/pdf/sodium-reduction_reduction-du-sodium-fra.pdf (Dernier accès le 16 juillet 2013).

Adams, M.R., Moss, M.O., 2008. Chapter 7 - Bacterial agents of foodborne illness. Dans: Adams, M.R., O Moss, M. (Eds.), Food Microbiology. RSC Publishing, Cambridge, UK., pp. 182-269.

Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D., Leung, T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. International Journal of Food Microbiology 69, 25-36.

Anonymous, 2003. Oxford agar - Modified (MC). Dans: Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. (Eds.), Progress in Industrial Microbiology - Handbook of Culture Media for Food Microbiology, vol. 37. Elsevier, United Kingdom, pp. 538-540.

ASPC, 2003. Agence de la santé publique du Canada : Maladies à déclaration obligatoire [En ligne]. URL: http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/list_f.html (Dernier accès le 12 novembre 2010).

ASPC, 2004. Agence de la santé publique du Canada : Principales causes de décès et d'hospitalisation au Canada. [En ligne]. URL: <http://origin.phac-aspc.gc.ca/publicat/lcd-pcd97/index-fra.php> (Dernier accès le 25 octobre 2010).

Back, J.P., Langford, S.A., Kroll, R.G., 1993. Growth of *Listeria monocytogenes* in Camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures. Journal of Dairy Research 60, 421-429.

Baillargeon, M.W., Bistline, R.G., Sonnet, P.E., 1989. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. Applied Microbiology and Biotechnology 30, 92-96.

Bae, D., Liu, C., Zhang, T., Jones, M., Peterson, S.N., Wang, C.L., 2012. Global gene expression of *Listeria monocytogenes* to salt stress. Journal of Food Protection 75, 906-912.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 61, 1-10.

Barr, S.I., 2010. Reducing dietary sodium intake: the Canadian context. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism 35, 1-8.

Bartsch, A.G., Walker, H.W., 1982. Effect of temperature, solute and pH on the tolerance of *Clostridium perfringens* to reduced water activities. Journal of Food Science 47, 1754-1755.

Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., von Eiff, C., 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. Journal of Clinical Microbiology 42, 4988-4995.

Bereksi, N., Gavini, F., Bénézech, T., Faille, C., 2002. Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *Journal of Applied Microbiology* 92, 556-565.

Bergholz, T.M., den Bakker, H.C., Fortes, E.D., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2010. Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne pathogens and disease* 7, 1537-1549.

Bidlas, E., Lambert, R.J.W., 2008. Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology* 124, 98-102.

Bolton, L.F., Frank, J.F., 1999. Simple method to observe the adaptative response of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Applied Microbiology* 29, 350-353.

Bozaris, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M., Nychas, G.-J.E., 2007. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology* 102, 796-805.

Breslin, P.A., Beauchamp, G.K., 1997. Salt enhances flavor by suppressing bitterness. *Nature* 387, 563-563.

Broadbent, J.R., Budinich, M.F., Steele, J.L., 2011. Cheese | Non-starter lactic acid bacteria. Dans: Fuquay, J.W. (Ed.-en-chef), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second éd. Academic Press, San Diego, USA. 639-644.

CCIL, 2012. Centre canadien d'information laitière : L'industrie laitière canadienne en chiffres [En ligne]. URL: http://www.dairyinfo.gc.ca/pdf/publication_2012edition.pdf (Dernier accès le 15 octobre 2012).

Champagne, C.P., 1998. Chapitre 1 - Production de ferments lactiques. Dans, *Caractéristiques des bactéries lactiques*. Edisem, La fondation des Gouverneurs, Agriculture et Agroalimentaire Canada, CRDA, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, pp. 1-10.

Chirife, J., 1994. Specific solute effects with special reference to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Engineering* 22, 409-419.

Cholet, O., 2006. Étude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire, Institut national agronomique Paris-Grignon, Paris, France.

Codex Alimentarius, 2010. Norme Codex pour le Camembert (codex stan 276-1973) [En ligne]. URL: www.codexalimentarius.org/input/download/standards/218/CXS_276f.pdf (Dernier accès le 30 août 2012).

Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 63-72.

Corne, P., 2004. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique, Université Montpellier I, Montpellier, France.

Crago, B., Ferrato, C., Drews, S.J., Svenson, L.W., Tyrrell, G., Louie, M., 2012. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiology* 32, 202-205.

Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y., 2011a. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology* 91, 127-150.

Cretenet, M., Nouaille, S., Thouin, J., Rault, L., Stenz, L., François, P., Hennekinne, J.-A., Piot, M., Maillard, M.B., Fauquant, J., Loubière, P., Le Loir, Y., Even, S., 2011b. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environmental Microbiology Reports* 3, 340-351.

Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Pollonio, M.A.R., Bolini, H.M.A., Celeghini, R.M.S., Granato, D., Shah, N.P., 2011. Cheeses with reduced sodium content: effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology* 22, 276-291.

Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* 53, 121-147.

D'amico, D.J., Druart, M.J., Donnelly, C.W., 2008. 60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. *Journal of Food Protection* 71, 1563-1571.

Daley, E.F., Farber, J.M., Warburton, D.W., 1997. A collaborative study for direct enumeration of low levels of *Listeria monocytogenes* from various foods. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 5, 193-203.

Donnelly, C.W., 2004. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. Dans: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology - Volume I: General aspects*. 3ème éd. Academic Press, Ireland, pp. 541-559.

Dötsch, M., Busch, J., Batenburg, M., Liem, G., Tareilus, E., Mueller, R., Meijer, G., 2009. Strategies to reduce sodium consumption: a food industry perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 841-851.

Doyle, M.E., Glass, K.A., 2010. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 44-56.

Drevets, D.A., Bronze, M.S., 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 53, 151-165.

El Haddad, L., Moineau, S., 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* phages. *American Society of Microbiology* May 24th. San Diego (CA), United States. M-797.

Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1008-1015.

Erkmen, O., 1995. Behavior of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta cheese during manufacture and ripening. *Journal of Food Protection* 58, 1201-1205.

Escobar, E., 2009. État des lieux des infections cutanées communautaires à *Staphylococcus aureus* producteurs de la leucocidine de Pantone-Valentine et propositions de prise en charge en médecine de ville, Thèse, Université de Paris (Paris 5), Paris, France.

Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology* 84, 207-216.

- Farber, J.** 2010. Listeriosis in Canada : Anatomy of an Outbreak, Lessons-Learned and Path Forward.
- Farber, J.M., Coates, F., Daley, E.,** 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 15, 103-105.
- Farkye, N.Y.,** 1999. Cheese | Microbiology of cheese-making and maturation. Dans: Robinson, R.K. (Ed.-en-chef), Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier, Oxford, UK. 381-387.
- FDA,** 2012. Food and Drug Administration: Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. [En ligne]. URL: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1622&SearchTerm=kcl> (Dernier accès le 19 décembre 2012).
- Fischer, P.W.F., Vigneault, M., Huang, R., Arvaniti, K., Roach, P.,** 2009. Sodium food sources in the Canadian diet. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism 34, 884-892.
- Fitzgerald, E., Buckley, J.,** 1985. Effect of total and partial substitution of sodium chloride on the quality of Cheddar cheese. Journal of Dairy Science 68, 3127-3134.
- FSA,** 2009. Food Standards Agency: Salt reduction targets [En ligne]. URL: <http://www.food.gov.uk/scotland/scotnut/salt/saltreduction#.UHVtQi5mJrY> (Dernier accès le 10 octobre 2012).
- Gandhi, M., Chikindas, M.L.,** 2007. Review - *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology 113, 1-15.
- Gaulin, C., Ramsay, D., Bekal, S.,** 2012. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008. Journal of Food Protection 75, 71-78.
- Geleijnse, J.M., Kok, F.J., Grobbee, D.E.,** 2003. Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: a metaregression analysis of randomised trials. Journal of Human Hypertension 17, 471-480.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., Farver, T.B.,** 1991. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheese stored at 4 to 30°C. Journal of Food Protection 54, 662-668.
- Gillaspy, A.F., Iandolo, J.J.,** 2009. *Staphylococcus*. Dans: Schaechter, M. (Ed.-en-chef), Encyclopedia of Microbiology, 3ème éd. Elsevier, San Diego, USA. 293-303.
- Gillis, J.-C.,** 2004. Manuel du salage en fromagerie - Théorie et pratiques. Arilait Recherches, Paris, France, 69 pages.
- Gouvernement du Québec,** 2011. Office québécois de la langue française - Le grand dictionnaire terminologique [En ligne]. URL: <http://www.gdt.oqlf.gouv.qc.ca/> (Dernier accès le 06 septembre 2012).
- Gouvernement du Québec,** 2012. Toxi-infections alimentaires - Bilan - 1er avril 2010 au 31 mars 2011 [En ligne]. URL: http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Toxi-infections_Bilanannuel2010-2011.pdf (Dernier accès le 29 août 2012).

Government of Canada, 2005. MFHPB-21: Enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods [En ligne]. URL : http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mfhp21-eng.pdf (Dernier accès le 17 février 2013).

Government of Canada, 2011. MFLP-74: Enumeration for *Listeria monocytogenes* in foods [En ligne]. URL : http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mlfp74-eng.pdf (Dernier accès le 17 février 2013).

Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauters, B.D., 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60, 1280-1288.

Grummer, J., Karalus, M., Zhang, K., Vickers, Z., Schoenfuss, T.C., 2012. Manufacture of reduced-sodium Cheddar-style cheese with mineral salt replacers. Journal of Dairy Science 95, 2830-2839.

Guinee, T.P., Fox, P.F., 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. Dans: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), Cheese: chemistry, physics and microbiology - Volume I: general aspects. 3ème éd. Academic Press, Ireland, pp. 207-259.

Guinee, T.P., O'Kennedy, B.T., 2007. Chapter 16 - Reducing salt in cheese and dairy spreads. Dans: Kilcast, D., Angus, F. (Eds.), Reducing salt in foods: practical strategies. CRC Press, Boca Raton, USA., pp. 316-357.

Guizani, N., Kasapis, S., Al-Attabi, Z.H., Al-Ruzeiki, M.H., 2002. Microbiological, physiochemical, and biochemical changes during ripening of Camembert cheese made of pasteurized cow's milk. International Journal of Food Properties 5, 483-494.

Hajmeer, M., Ceylan, E., Marsden, J.L., Fung, D.Y.C., 2006. Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. Food Microbiology 23, 446-452.

Hamon, M.A., Ribet, D., Stavru, F., Cossart, P., 2012. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. Trends in Microbiology 20, 360-368.

He, F.J., MacGregor, G.A., 2002. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. Journal of Human Hypertension 16, 761-770.

Health Canada, FDA, 2012. Joint Food and Drug Administration / Health Canada Quantitative Assessment of the Risk of Listeriosis from Soft-Ripened Cheese Consumption in the United States and Canada: Draft Report. [En ligne]. URL : <http://www.fda.gov/downloads/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/UCM338617.pdf>. (Dernier accès le 19 avril 2013)

Hennekinne, J.-A., 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive, Thèse, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris, France.

Henriksen, S.D., 1978. Chapter I - Serotyping of Bacteria. Dans: Bergan, T., Norris, J.R. (Eds.), Methods in Microbiology, vol. 12. Academic Press, pp. 1-13.

Hypertension Canada, 2010. Excès de sodium alimentaire: Impact sur l'hypertension et les effets sur la santé [En ligne]. URL: <http://www.hypertension.ca/fr/ressources-educatives-du-pech-dp7> (Dernier accès le 11 septembre 2012).

ICIS, 2012. Institut canadien d'information sur la santé : Indicateurs de mortalité évitable [En ligne]. URL: http://www.cihi.ca/cihi-ext-portal/internet/fr/document/health+system+performance/indicators/health/release_24may12_fig1 (Dernier accès le 09 octobre 2012).

IOM, 2005. Institute of Medicine: Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate National Academy Press, Washington, USA, 640 pages.

IOM, 2013. Institute of Medicine: Sodium Intake in Populations: Assessment of Evidence [Prepublication copy: Uncorrected proofs] National Academy of Sciences, Washington, USA, 170 pages.

Ivanek, R., Grohn, Y.T., Tauer, L.W., Wiedmann, M., 2004. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 513-523.

Jadhav, S., Bhav, M., Palombo, E.A., 2012. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* 88, 327-341.

Jeffers, G.T., Bruce, J.L., McDonough, P.L., Scarlett, J., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology-SGM* 147, 1095-1104.

Johnson, M.E., Kapoor, R., McMahon, D.J., McCoy, D.R., Narasimmon, R.G., 2009. Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 252-268.

Karppanen, H., Mervaala, E., 2006. Sodium intake and hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* 49, 59-75.

Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P., Roussis, I.G., 2000. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal* 10, 635-646.

Kim, H.J., Oh, S.W., 2010. Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. *Food Science and Biotechnology* 19, 1097-1101.

Knabel, S.J., Reimer, A., Verghese, B., Lok, M., Ziegler, J., Farber, J., Pagotto, F., Graham, M., Nadon, C.A., Gilmour, M.W., 2012. Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 1748-1751.

Koenig, S., Marth, E.H., 1982. Behavior of *Staphylococcus aureus* in Cheddar cheese made with sodium chloride or a mixture of sodium chloride and potassium chloride. *Journal of Food Protection* 45, 996-1002.

Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* 21, 415-422.

- Lado, B.H., Yousef, A.E.**, 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. Dans: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*, listeriosis and food safety. 2ème éd. CRC Press, New York, USA, pp. 157-214.
- Lamont, R.F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J.P., Vaisbuch, E., Kim, S.K., Uldbjerg, N., Romero, R.**, 2011. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine* 39, 227-236.
- Larpent, J.-P.**, 2004. Chapitre 1 - Taxonomie et physiologie des *Listeria*. Dans: Larpent, J.-P. (Ed.), *Listeria*. 3ème éd. Editions TEC & DOC, Lavoisier, France, pp. 1-47.
- Larsen, J., Enright, M.C., Godoy, D., Spratt, B.G., Larsen, A.R., Skov, R.L.**, 2012. Multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus aureus*: revision of the *gmk* locus. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2538-2539.
- Laupland, K.B., Church, D.L., Mucenski, M., Sutherland, L.R., Davies, H.D.**, 2003. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Infectious Diseases* 187, 1452-1459.
- Lawrence, G., Salles, C., Septier, C., Busch, J., Thomas-Danguin, T.**, 2009. Odour-taste interactions: a way to enhance saltiness in low-salt content solutions. *Food Quality and Preference* 20, 241-248.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Buono, F., Lambert, D., Latrille, E., Spinnler, H.-E., Corrieu, G.**, 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research* 71, 346-354.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M.**, 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology* 6, 41-46.
- Lesage, L., Sauvageot, F., Voilley, A., Lorient, D.**, 1992. Effect of sodium chloride concentration and ripening time on the sensory characteristics of Camembert cheese with addition of magnesium. *Lait* 72, 73-85.
- Lesage, L., Voilley, A., Lorient, D., Bezard, J.**, 1993. Sodium-chloride and magnesium-chloride affected by ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Science* 58, 1303-1306.
- Lessard, M.-H., Bélanger, G., St-Gelais, D., Labrie, S.**, 2012. The composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1813-1819.
- Leuschner, R.G.K., Boughtflower, M.P.**, 2002. Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin. *Journal of Food Protection* 65, 508-514.
- Lindsay, R.C., Hargett, S.M., Bush, C.S.**, 1982. Effect of sodium/potassium (1:1) chloride and low sodium chloride concentrations on quality of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 65, 360-370.
- Liu, S., Puri, V.M., Demirci, A.**, 2007. Spatial distribution of population of *Listeria monocytogenes* during manufacturing and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Safety* 27, 43-55.
- Locke, K.W., Fielding, S.**, 1994. Enhancement of salt intake by choline chloride. *Physiology & Behavior* 55, 1039-1046.

Loncarevic, S., Jørgensen, H.J., Løvseth, A., Mathisen, T., Rørvik, L.M., 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology* 98, 344-350.

MAPAQ, 2010. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec : Les agents pathogènes les plus souvent associés aux toxi-infections alimentaires [En ligne]. URL: http://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Laboratoire/agents_pathogenes.pdf (Dernier accès le 13 avril 2013).

McClure, P.J., Kelly, T.M., Roberts, T.A., 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 14, 77-92.

McSweeney, P.L.H., G., O., Fox, P.F., 2004. Diversity of Cheese : an overview. Dans: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese : chemistry, physics and microbiology - Volume 2 : major cheese groups*. 3^{ème} éd. Academic Press, Ireland, pp. 1-23.

Medvedová, A., Valík, L., Studeničová, A., 2009. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Sciences* 27, 28-35.

Mehta, A., Tatini, S.R., 1992. Behavior of *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese made with NaCl or equimolar mixture of NaCl and KCl. *Journal of Dairy Science* 75, 93.

Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C.E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Vernozy-Rozand, C., 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology* 85, 537-544.

Miller, K.J., Zelt, S.C., Bae, J.H., 1991. Glycine betaine and proline are the principal compatible solutes of *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 23, 131-137.

Miller, A.J., 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 55, 414-418.

Ministère de la justice, 2012. Règlement sur les aliments et drogues [En ligne]. URL: http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/C.R.C.,_ch._870/ (Dernier accès le 30 août 2012).

Necidová, L., Štásková, Z., Pospišilová, M., Janštová, B., Strejček, J., Dušková, M., Karpíšková, R., 2009. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Sciences* 27, 127-133.

Nichol, A.W., 1999. Cheese | Mould-ripened varieties. Dans: Robinson, R.K. (Ed.-en-chef), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, Oxford, UK. 387-393.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V., 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98, 73-79.

- Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., Komatsuzawa, H.,** 2011. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8097-8105.
- Ostyn, A., Guillier, F., Prufer, A.L., Papinaud, I., Messio, S., Krys, S., Lombard, B., Hennekinne, J.A.,** 2011. Intra-laboratory validation of the Ridascreen® SET Total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Letters in Applied Microbiology* 52, 468-474.
- Piccinin, D.M., Shelef, L.A.,** 1995. Survival of *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *Journal of Food Protection* 58, 128-131.
- Portnoy, D.A., Auerbuch, V., Glomski, I.J.,** 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *Journal of Cell Biology* 158, 409-414.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M.W.,** 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in soft cheeses. *Journal of Dairy Science* 81, 1810-1817.
- Reddy, K.A., Marth, E.H.,** 1993. Composition of Cheddar cheese made with sodium chloride and potassium chloride either singly or as mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis* 6, 354-363.
- Reddy, K.A., Marth, E.H.,** 1995. Lactic-acid bacteria in Cheddar cheese made with sodium chloride, potassium chloride or mixtures of the two salts. *Journal of Food Protection*. 58, 62-69.
- Ribeiro, M.H., Manha, S., Brito, L.,** 2006. The effects of salt and pH stress on the growth rates of persistent strains of *Listeria monocytogenes* collected from specific ecological niches. *Food Research International* 39, 816-822.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M.,** 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 70, 163-173.
- Rockwell, G.E., Ebertz, E.G.,** 1924. How salt preserves. *Journal of Infectious Diseases* 35, 573-575.
- Rocourt, J., Buchrieser, C.,** 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position. Dans: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, listeriosis and food safety*. Second éd. CRC Press, New York, USA, pp. 1-20.
- Rode, T.M., Mørsetrø, T., Langsrud, S., Langsrud, Ø., Vogt, G., Holck, A.,** 2010. Responses of *Staphylococcus aureus* exposed to HCl and organic acid stress. *Canadian Journal of Microbiology* 56, 777-792.
- Ryser, E.T., Marth, E.H.,** 1987a. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 50, 7-13.
- Ryser, E.T., Marth, E.H.,** 1987b. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection* 50, 372-378.
- Sadler, K., Nicholson, S., Steer, T., Gill, V., Bates, B., Tipping, S., Cox, L., Lennox, A., Prentice, A.,** 2011. National diet and nutrition Survey - Assessment of dietary sodium in adults (aged 19 to 64 years) in England, 2011 [En ligne]. URL: https://www.wp.dh.gov.uk/transparency/files/2012/06/Sodium-Survey-England-2011_Text_to-DH_FINAL1.pdf (Dernier accès le 10 octobre 2012).

Santé Canada, 2006. Liste des additifs alimentaires autorisés au Canada [En ligne]. URL: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/diction/dict_food-alim_add-fra.php#c (Dernier accès le 27 septembre 2012).

Santé Canada, 2010a. La stratégie de réduction du sodium pour le Canada - Recommandations du Groupe de travail sur le sodium [En ligne].

URL: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/nutrition/sodium/strateg/reduct-strat-fra.pdf (Dernier accès le 17 février 2013).

Santé Canada, 2010b. Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger [En ligne].

URL: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-fra.pdf (Dernier accès le 29 octobre 2012).

Santé Canada, 2012. Document d'orientation destiné à l'industrie alimentaire sur la réduction du sodium dans les aliments transformés. [En ligne]. URL: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/guide-id/2012-sodium-reduction-indust-fra.pdf (Dernier accès le 17 février 2013).

Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M.T., Lindqvist, R., Barker, G.C., Radstrom, P., 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2, 580-592.

Schroeder, C.L., Bodyfelt, F.W., Wyatt, C.J., McDaniel, M.R., 1988. Reduction of sodium chloride in Cheddar cheese: effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *Journal of Dairy Science* 71, 2010-2020.

Schwartzman, M.S., Belessi, X., Butler, F., Skandamis, P., Jordan, K., 2010. Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1790-1799.

Seeliger, H.P.R., Höhne, K., 1979. Chapter II - Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Dans: Bergan, T., Norris, J.R. (Eds.), *Methods in microbiology*, vol. 13. Academic Press, pp. 31-49.

Shrestha, S., Grieder, J.A., McMahon, D.J., Nummer, B.A., 2011. Survival of *Listeria monocytogenes* introduced as a post-aging contaminant during storage of low-salt Cheddar cheese at 4, 10, and 21°C. *Journal of Dairy Science* 94, 4329-4335.

Sofos, J.N., 1984. Antimicrobial effects of sodium and other ions in foods: a review. *Journal of Food Safety* 6, 45-78.

Sousa, M.J., 2003. Cheeses | Surface mold-ripened cheese varieties. Dans: Caballero, B. (Ed.-en-chef), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2ème éd. Elsevier, Oxford, UK. 1122-1129.

Spinnler, H.-E., Gripon, J.-C., 2004. Surface mould-ripened cheeses. Dans: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology - Volume 2: major cheese groups*. Academic Press, Ireland, pp. 157-174.

Spratt, B.G., 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Current Opinion in Microbiology* 2, 312-316.

St-Gelais, D., Tirard-Collet, P., 2002. Chapitre 6 : Fromage. Dans: Vignola, C.L. (Ed.), *Science et technologie du lait - Transformation du lait*. Presses internationales Polytechnique, Montréal, Canada, pp. 349-416.

- Staden, R., Judge, D.P., Bonfield, J.K.**, 2003. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. Dans: Krawetz, S.A., Womble, D.D. (Eds.), Introduction to bioinformatics. A theoretical and practical approach. Human Press Inc., USA, pp. 327-344.
- Stamler, J., Rose, G., Stamler, R., Elliott, P., Dyer, A., Marmot, M.**, 1989. Intersalt study findings. Public health and medical care implications. Hypertension 14, 570-577.
- Stewart, C.M., Cole, M.B., Legan, J.D., Slade, L., Vandeven, M.H., Schaffner, D.W.**, 2002. *Staphylococcus aureus* growth boundaries: Moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. Applied and Environmental Microbiology 68, 1864-1871.
- Sullivan, C.B., Diggle, M.A., Clarke, S.C.**, 2005. Multilocus sequence typing - Data analysis in clinical microbiology and public health. Molecular Biotechnology 29, 245-254.
- Sutherland, B.J.**, 2002. Salting of cheese. Dans: Fuquay, J.W. (Ed.-en-chef), Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, San Diego, USA. 293-300.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Roberts, T.A.**, 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. International Journal of Food Microbiology 21, 217-236.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.**, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28, 2731-2739.
- Taormina, P.J.**, 2010. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 50, 209-227.
- Tatini, S.R., Jezeski, J.J., Morris, H.A., Olson, J.C., E.P., C.**, 1971. Production of Staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby Cheeses. Journal of Dairy Science 54, 815-825.
- Terplan, G., Schoen, R., Springmeyer, W., Degle, I., Becker, H.**, 1986. Occurrence, behavior and significance of *Listeria* in milk and dairy products. Archiv Fur Lebensmittel hygiene 37, 131-137.
- Todd, E.C.D., Notermans, S.**, 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control 22, 1484-1490.
- Townsend, D.E., Wilkinson, B.J.**, 1992. Proline transport in *Staphylococcus aureus* - A high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. Journal of Bacteriology 174, 2702-2710.
- Tuckey, S.L., Witter, L.D., Stiles, M.E., Ordal, Z.J.**, 1964. Relation of cheese-making operations to survival and growth of *Staphylococcus aureus* in different varieties of cheese. Journal of Dairy Science 47, 604-&.
- Vernozy-Rozand, C., Meyrand, A., Mazuy, C., Delignette-Muller, M.L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Richard, Y.**, 1998. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. Journal of Dairy Research 65, 273-281.
- Vuilleumard, J.-C.**, 2008. La fabrication fromagère. Dans: Département des sciences des aliments et de nutrition, U.L. (Ed.), Produits laitiers STA-20282, Québec, Canada, pp. 1-127.

Wagner, M., McLauchlin, J., 2008. Chapter 1 - Biology. Dans: Liu, D. (Ed.), Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 3-25.

Warriner, K., Namvar, A., 2009. What is the hysteria with *Listeria* ? Trends in Food Science & Technology 20, 245-254.

Webster, J.L., Dunford, E.K., Hawkes, C., Neal, B.C., 2011. Salt reduction initiatives around the world. Journal of Hypertension 29, 1043-1050.

Whelton, P.K., Appel, L.J., Sacco, R.L., Anderson, C.A.M., Antman, E.M., Campbell, N., Dunbar, S.B., Frohlich, E.D., Hall, J.E., Jessup, M., Labarthe, D.R., MacGregor, G.A., Sacks, F.M., Stamler, J., Vafiadis, D.K., Van Horn, L.V., 2012. Sodium, blood pressure, and cardiovascular disease. Circulation 126, 2880-2889.

WHO, 2007. World Health Organization: Reducing salt intake in populations. Report of a WHO Forum and Technical Meeting. OMS Document Production Services, Genève, Suisse, 61 pages.

WHO, 2013. World Health Organization: Mapping salt reduction initiatives in the WHO European Region, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 59 pages.

Young, K.M., Foegeding, P.M., 1993. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott-A and the effect on intracellular pH. Journal of Applied Bacteriology 74, 515-520.

Zaika, L.L., Fanelli, J.S., 2003. Growth kinetics and cell morphology of *Listeria monocytogenes* Scott A as affected by temperature, NaCl and EDTA. Journal of Food Protection 66, 1208-1215.

Annexe I : Charte de sérotypage *L. monocytogenes*

	Antigènes O														Antigènes H				
1/2a	I	II	(III)*													A	B		
1/2b	I	II	(III)													A	B	C	
1/2c	I	II	(III)														B		D
3a		II	(III)	IV												A	B		
3b		II	(III)	IV							(XII)	(XIII)				A	B	C	
3c		II	(III)	IV							(XII)	(XIII)					B		D
4a			(III)		(V)		VII		IX							A	B	C	
4ab			(III)		V	VI	VII		IX	X						A	B	C	
4b			(III)		V	VI										A	B	C	
4c			(III)		V		VII									A	B	C	
4d			(III)		(V)	VI		VIII								A	B	C	
4e			(III)		V	VI		(VIII)	(IX)							A	B	C	
5 (ivanovii)			(III)		(V)	VI		(VIII)		X						A	B	C	
6a (innocua)			(III)		V	(VI)	(VII)		(IX)					XV		A	B	C	
6b (innocua)			(III)		(V)	(VI)	(VII)		(IX)	X	XI					A	B	C	
7			(III)									XII	XIII			A	B	C	
<i>L.grayi</i>			(III)									XII		XIV					E
<i>L.murrayi</i>			(III)									XII		XIV					E

* () Facteur peut être présent ou absent.