



HAL
open science

La connaissance approfondie des communautés bactériennes des aliments et ses conséquences pour l'utilisation de la biopréservation

Monique M. Zagorec, Marie-Christine Champomier Verges, Stephane S. Chaillou, Sabine Leroy, S. Christieans

► To cite this version:

Monique M. Zagorec, Marie-Christine Champomier Verges, Stephane S. Chaillou, Sabine Leroy, S. Christieans. La connaissance approfondie des communautés bactériennes des aliments et ses conséquences pour l'utilisation de la biopréservation. *Innovations Agronomiques*, 2015, 44, pp.15-24. 10.15454/1.462262826089343E12 . hal-02641750

HAL Id: hal-02641750

<https://hal.inrae.fr/hal-02641750>

Submitted on 28 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

La connaissance approfondie des communautés bactériennes des aliments et ses conséquences pour l'utilisation de la biopréservation

Zagorec M.^{1,2}, Champomier-Vergès M.^{3,4}, Chaillou S.^{3,4}, Leroy S.⁵, Christieans S.⁶

¹ INRA, UMR1014 Secalim, F-44307 Nantes,

² LUNAM Université, Oniris, F-44307Nantes,

³ INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas,

⁴ AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas,

⁵ INRA, UR454 Microbiologie, F- 63122 Saint-Genès Champanelle

⁶ ADIV, 10, rue Jacqueline Auriol, F-63039, Clermont-Ferrand

Correspondance : monique.zagorec@oniris-nantes.fr

Résumé

Grace aux méthodes de séquençage à haut débit, les communautés bactériennes présentes dans les aliments sont maintenant mieux connues. Les données acquises au cours de ces dernières années remettent en cause certains dogmes ou certaines habitudes dans l'analyse microbiologique des denrées alimentaires, mais ouvrent aussi de nouvelles possibilités. En effet, des espèces jusque-là inconnues ou inattendues sont parfois présentes en grand nombre dans les aliments. Un regard approfondi de la dynamique de ces populations au cours de la conservation a mis en évidence des synergies comme des exclusions et parfois remis en cause le rôle altérant de certaines espèces ou au contraire révélé un potentiel altérant inattendu. Enfin, les données de séquençage à haut débit ont montré les limites des méthodes culturales classiques utilisées pour garantir la salubrité ou la date limite de consommation des aliments. Elles pourraient concourir à une utilisation mieux maîtrisée et plus performante de la biopréservation par une connaissance accrue des interactions bactériennes lors de l'altération et lors de l'utilisation de flores protectrices, et contribuer à envisager la révision des critères utilisés pour l'analyse microbiologique des aliments et leur salubrité.

Mots-clés : Flores protectrices, aliments, date limite de consommation, réglementation

Abstract: The consequences of an extensive description of food microbial communities on biopreservation practice

Thanks to the development of high throughput sequencing technologies, the bacterial communities present in food are now better described. The data recently acquired question some dogmas or uses in the field of food microbiology, but also enable new possibilities. Indeed, some yet unknown or unexpected species may be abundant in foodstuffs. An extensive analysis of the dynamics of these populations during shelf-life has evidenced some co-occurrence or co-exclusion and sometimes questioned the spoiling potential of some species or, on the contrary, revealed an unexpected spoilage capacity for others. Last, high throughput sequencing data have shown the limitations of cultural methods for ensuring safety or for the determination of the use-by-date. This might enable a more controlled and more efficient use of biopreservation through an increased knowledge of bacterial interactions that occur during spoilage and when protective cultures are used, in particular by revisiting the criteria that are commonly used for characterizing food microbiology.

Keywords: Protective cultures, foodstuffs, use-by-date, regulations

Introduction

Les aliments carnés, qu'il s'agisse de viandes ou de produits de la mer, sont inévitablement contaminés lors des processus d'abattage, d'éviscération, de découpe et au cours des étapes de transformation de la matière première et sont d'excellents supports pour la croissance des bactéries. Des mesures strictes d'hygiène en élevage, dans les abattoirs et dans les usines de transformation contribuent à limiter les contaminations mais ne peuvent les éviter totalement. Lors du stockage des produits jusqu'à leur date limite de consommation (DLC), les communautés bactériennes vont pouvoir se développer selon que les conditions leur seront plus ou moins favorables. Ainsi, des paramètres tels que la température, la disponibilité de l'eau (caractérisée par l' a_w), le pH ou encore les gaz présents dans l'atmosphère de l'emballage, influencent la croissance des communautés bactériennes présentes sur les aliments. On parle alors de facteurs abiotiques par opposition aux facteurs biotiques qui sont représentés par les organismes vivants, c'est à dire ici les bactéries de l'écosystème. Les différentes espèces composant ces communautés bactériennes vont en outre interagir entre elles et utiliser les composés (sucres, peptides, acides aminés, vitamines, etc.) de l'aliment comme nutriments pour se développer. Afin de garantir la qualité microbiologique des aliments, il existe plusieurs normes qui permettent de déterminer la charge bactérienne présente dans les aliments et d'estimer son évolution jusqu'à la DLC. En ce qui concerne certaines bactéries pathogènes, l'absence ou la présence en dessous d'un certain seuil est exigée. Pour estimer la salubrité, c'est généralement la flore totale qui est mesurée, avec, suivant les produits, le comptage d'autres catégories bactériennes comme les bactéries lactiques, les entérobactéries, etc. La plupart du temps, ces mesures sont effectuées grâce à des méthodes dites culturales, basées sur des dénombrements réalisés à l'aide de milieux de cultures plus ou moins sélectifs d'espèces, de genres ou de familles bactériennes. Ainsi, on a longtemps considéré que les communautés bactériennes présentes sur nos aliments étaient bien connues, contrairement à d'autres écosystèmes comme les sols ou les microbiotes animaux dans lesquels on estimait que plus de 90% des espèces présentes nous étaient inconnues ou étaient non cultivables en conditions de laboratoire. Lors de ces dernières années, de nouvelles approches basées sur le séquençage de l'ADN à haut débit a permis une description plus précise des communautés bactériennes présentes dans nos aliments : leur identité et leur provenance sont maintenant mieux connues (Chaillou *et al.*, 2015 ; Renault *et al.*, 2015). La dynamique des populations lors de la conservation des aliments a également été étudiée de manière plus approfondie. Les résultats obtenus par ce type d'approche ont ébranlé certains dogmes mais ouvrent de nouvelles pistes pour mieux garantir la qualité microbiologique des aliments carnés.

1. Les communautés bactériennes des aliments carnés

1.1 Une analyse d'envergure sur une sélection de huit produits

Dans le cadre du projet ANR Ecobiopro, qui a été réalisé entre 2011 et 2014, un consortium¹ de 10 partenaires (académiques, centres techniques et industriels) s'est intéressé aux communautés bactériennes présentes sur 4 produits carnés et 4 produits de la mer communément trouvés dans le commerce (Chaillou *et al.*, 2015). Il s'agissait de steak haché de bœuf, de viande de veau hachée, de dés de lardons nature, de saucisses de volaille, de filets de cabillaud et de saumon, de saumon fumé et de crevettes cuites décortiquées. Tous les produits, excepté le saumon fumé conservé sous vide, étaient conservés sous atmosphère protectrice. Les 8 produits étudiés ont été choisis pour différentes raisons.

¹ Consortium ECOBIOPRO : S. Chaillou, A. Chaulot-Talmon, H. Caekebeke, M. Cardinal, S. Christieans, C. Denis, M.H. Desmonts, X. Dousset, C. Feurer, E. Hamon, J.J. Joffraud, S. La Carbona, F. Leroi, S. Leroy, S. Lorre, S. Macé, M.F. Pilet, H. Prévost, M. Rivollier, D. Roux, R. Talon, M. Zagorec, M.C. Champomier-Vergès

- Le bœuf haché est un produit populaire ancré dans la consommation courante dont les communautés bactériennes ont été bien étudiées par des approches essentiellement culturelles. Il fait l'objet d'une surveillance sanitaire particulière en raison des épidémies dues aux *Escherichia coli* entérohémorragiques en lien avec sa consommation. En revanche, la viande de veau hachée est un produit nouveau pour lequel il existe encore peu de recul. Il était pertinent de comparer ces deux produits voisins et subissant des procédés identiques.
- Les dés de lardons sont des produits dont la commercialisation est en plein essor. Préparés à partir de poitrine de porc saumurée, ces produits sont relativement stables et se caractérisent par une DLC particulièrement longue, d'où l'intérêt d'en étudier la microbiologie.
- Les saucisses de volailles représentent elles aussi un produit relativement nouveau, constitué de différents ingrédients (gras, maigre, épices) et susceptible de s'altérer rapidement.
- Le filet de cabillaud vendu sous forme de produit conservé sous atmosphère protectrice est également un produit nouvellement développé et qu'il était intéressant de comparer au filet de saumon, vendu lui aussi sous atmosphère protectrice, mais depuis longtemps commercialisé. Par ailleurs, ce dernier pouvait être comparé au saumon fumé, déjà largement étudié d'un point de vue microbiologique.
- Les crevettes cuites décortiquées elles aussi avaient été l'objet de caractérisation microbiologique et présentaient en outre l'intérêt de subir un traitement thermique, susceptible de détruire au moins partiellement la flore bactérienne.

Afin de réaliser une étude d'ampleur et d'obtenir des résultats significatifs, 10 lots de chacun des produits ont été analysés à T_0 (au moment de la production) et une fois altérés après une rupture de la chaîne du froid (T_{alt}). La population bactérienne a été déterminée par les méthodes culturelles classiques et par séquençage à haut débit. Pour ce faire, l'ADN bactérien a été extrait à partir des aliments, et une portion de l'ADN ribosomique (ADNr) a été amplifiée par PCR de manière à générer des bibliothèques pour le séquençage. Pour chaque produit le nombre de séquences obtenues se situaient entre ~3 000 et ~28 000. Les données ont été normalisées sur une base de 15 000 lectures par lot, permettant une description en profondeur des bactéries présentes. Une base de données de séquences d'ADNr a été constituée à partir de bases de données existantes de manière à n'intégrer que des séquences de bonne qualité. Ainsi, les séquences obtenues à partir de tous les lots d'aliments ont pu être comparées à celles de la base de données et assignées à des unités taxonomiques ou taxons. Le nombre de fois où une même séquence était lue reflétait son abondance et permettait donc d'estimer l'abondance relative des bactéries portant cette séquence parmi la communauté étudiée. Les résultats ont été confrontés à ceux obtenus par méthodes culturelles et, pour certains produits, à ceux obtenus par d'autres méthodes moléculaires.

1.2 Une signature spécifique de chaque produit

Sur les produits frais, le nombre de taxons variait d'environ 50 à plus de 300, suivant les produits. Une fois les produits altérés, la charge bactérienne globale augmentait mais était caractérisée par un nombre de taxons différents bien plus faible (~10 à 60 suivant les lots et les aliments) montrant que seules certaines espèces bactériennes étaient devenues dominantes. L'identification des séquences a permis dans la plupart des cas de remonter jusqu'au niveau de l'espèce, confirmant que cette approche est bien plus performante que les méthodes culturelles (pour exemple, des milieux dédiés à l'énumération des bactéries lactiques ne permettent de déterminer ni l'espèce ni même le genre). Pour certains produits de la mer, les résultats ont été comparés à ceux d'une méthode moléculaire basée sur la migration de fragments d'ADNr par comparaison à des fragments servant d'étalon (la méthode TTGE pour *temporal temperature gel electrophoresis*). Dans l'ensemble, les bactéries dont la présence était détectée par TTGE étaient bien représentées dans les résultats obtenus par séquençage haut débit, mais en revanche, le séquençage a révélé la présence d'espèces supplémentaires, dont certaines n'ont

été décrites que par leur séquence d'ADN et ne sont pas cultivées à ce jour. L'analyse globale des résultats a montré que des espèces ou groupes d'espèces étaient communs à tous les produits analysés, d'autres étaient spécifiques soit des produits de la mer soit des produits carnés, d'autres encore n'étaient spécifiques que d'un produit. Ces groupes d'espèces représentaient donc des signatures spécifiques. Ces signatures étaient particulièrement marquées sur les produits frais. En effet, après altération, la diversité des taxons présents diminuant, les signatures s'atténaient (Chaillou *et al.*, 2015). Entre le temps initial de la production et le temps final où les aliments étaient altérés, l'observation de la dynamique des communautés bactériennes a permis d'observer deux phénomènes différents. Tout d'abord un phénomène de convergence a été observé entre le veau et le bœuf haché. Ces deux types d'aliments très proches possèdent des communautés légèrement différentes à l'issue de leur production, mais lors du stockage, des communautés se développent et se structurent à l'identique. A l'inverse, un phénomène de divergence peut s'observer entre le filet de saumon frais et le filet de saumon fumé dont les communautés, très similaires du départ, se différencient de manière conséquente à l'issue du procédé de salaison/fumage et pendant le stockage. Ainsi, le processus de salaison peut être à l'origine de convergence de communautés bactériennes comme dans le cas des observations faites entre deux produits très différents : les dés de lardons et les merguez de volaille. Ces aliments dont la diversité bactérienne des produits de départ se distingue très largement l'une de l'autre, évoluent néanmoins vers des assemblages bactériens semblables. Cette observation reflète parfaitement le rôle sélectif apporté par le sel. Bien qu'opposés dans les faits, ces phénomènes sont néanmoins la traduction d'un processus identique : la sélectivité engendrée à la fois par le procédé (ajout d'ingrédients tels que le sel, traitement par fumaison) et à la fois par la valeur nutritionnelle que chaque aliment représente pour la communauté bactérienne. Ainsi, selon les matrices alimentaires considérées, les communautés bactériennes présentes au départ vont se structurer en fonction des ressources métaboliques disponibles pour leur croissance, selon le degré de compétition ou de synergie pour utiliser ces ressources et selon leur capacité à résister aux conditions physico-chimiques qui leur sont imposées (basse température, concentration élevée en chlorure de sodium).

1.3 Une variabilité des communautés suivant les produits

Toujours dans le cadre du projet Ecobiopro, ce sont 10 lots de chaque produit qui ont été analysés. Suivant les aliments, les 10 lots provenaient d'un même fournisseur ou au contraire avaient des origines différentes. Les résultats ont montré que malgré une signature commune, une grande variabilité existait entre les différents lots d'un même produit, y compris lorsqu'ils provenaient d'un même producteur (Chaillou *et al.*, 2015).

Une autre étude menée sur des découpes de volailles, vendues en grande surface sous atmosphère protectrice et analysées à DLC, a également montré une signature commune à tous les lots, accompagnée d'une très grande variabilité entre les lots (Rouger *et al.*, 2015). Dans ce dernier cas, il semble de plus exister une signature liée à l'abattoir dont proviennent les découpes. Ceci est en accord avec l'analyse faite lors du projet Ecobiopro : les communautés bactériennes contaminant les aliments carnés proviennent de l'environnement (sols, eau, sédiments) et des animaux (peau, cuir, viscères etc.) (Chaillou *et al.*, 2015).

1.4 Des espèces inconnues présentes sur les aliments

Le Tableau 1 résume l'ensemble des résultats sur les huit produits étudiés dans le cadre du projet Ecobiopro. On observe que parmi les genres bactériens détectés aussi bien à T_0 qu'au moment de l'altération (T_{alt}), certaines séquences ne correspondaient à aucune espèce déjà connue. L'analyse des filets de cabillaud vendus sous atmosphère protectrice a révélé que parmi les 10 lots analysés après altération, la moitié présentait une séquence d'ADNr majoritaire qui ne correspondait à aucune espèce bactérienne décrite à ce jour. La séquence n'était en effet identique à aucune bactérie connue et sa similarité avec les séquences disponibles dans les bases de données permettait de la classer parmi les *Fusobacteriaceae*, mais ne permettait pas d'identification plus fine. D'autres séquences appartenant à

des espèces ou des groupes déjà détectés mais non encore cultivés ont également été trouvées dans les différents aliments analysés, mais de manière sous dominante ou minoritaire.

Tableau 1 : Communautés bactériennes dominantes sur l'ensemble des 8 produits étudiés dans le cadre du projet Ecobiopro. Les 31 genres prépondérants sont indiqués ainsi que leur abondance relative (\log_{10} du nombre de fois où leur séquence a été obtenue). Les genres présents à T_0 et minoritaires à T_{alt} sont indiqués en bleu clair, ceux minoritaires à T_0 mais devenant dominants à T_{alt} sont indiqués en mauve. Les autres genres sont dominants dès le moment de production et le restent jusqu'à ce que l'altération apparaisse.

T_0		T_{alt}	
<i>Brochothrix</i>	5,3	<i>Lactobacillus</i>	6,1
<i>Photobacterium</i>	5,2	<i>Leuconostoc</i>	5,6
<i>Lactobacillus</i>	4,8	<i>Lactococcus</i>	5,4
<i>Leuconostoc</i>	4,7	<i>Carnobacterium</i>	5,3
<i>Lactococcus</i>	4,7	<i>Brochothrix</i>	5,1
<i>Carnobacterium</i>	4,5	<i>Photobacterium</i>	5,1
<i>Bactérie non cultivée CK-1C4-19</i>	4,5	<i>Fusobacteriaceae non cultivée</i>	4,8
<i>Flavobacterium</i>	4,5	<i>Serratia</i>	4,6
<i>Weissella</i>	4,4	<i>Streptococcus</i>	4,3
<i>Fusobacteriaceae non cultivée</i>	4,4	<i>Vagococcus</i>	4,2
<i>Streptococcus</i>	4,4	<i>Staphylococcus</i>	4,1
<i>Chryseobacterium</i>	4,3	<i>Weissella</i>	4,1
<i>Staphylococcus</i>	4,3	<i>Hafnia</i>	3,9
<i>Propionibacterium</i>	4,1	<i>Vibrio</i>	3,8
<i>Candidatus bacilloplasma</i>	4,1	<i>Shewanella</i>	3,7
<i>Bacillus</i>	4,0	<i>Clostridium</i>	3,6
<i>Pseudomonas</i>	4,0	<i>Myroides</i>	3,5
<i>Arthrobacter</i>	4,0	<i>Aerococcus</i>	3,5
<i>Janthinobacterium</i>	3,9	<i>Acinetobacter</i>	3,4
<i>Fusobacterium</i>	3,9	<i>Flavobacterium</i>	3,3
<i>Macrococcus</i>	3,9	<i>Enterococcus</i>	3,2
<i>Psychrobacter</i>	3,9	<i>Trichococcus</i>	3,2
<i>Myroides</i>	3,9	<i>Aeromonas</i>	3,0
<i>Sarcina</i>	3,9	<i>Bactérie non cultivée CK-1C4-19</i>	2,9
<i>Enterococcus</i>	3,8	<i>Morganella</i>	2,9
<i>Corynebacterium</i>	3,8	<i>Planomicrobium</i>	2,8
<i>Leptotrichaceae non cultivée</i>	3,7	<i>Pseudomonas</i>	2,8
<i>Acinetobacter</i>	3,6	<i>Moritella</i>	2,8
<i>Aliivibrio</i>	3,6	<i>Janthinobacterium</i>	2,7
<i>Comamonas</i>	3,6	<i>Hydrogenophilus</i>	2,6
<i>Vagococcus</i>	3,6	<i>Yersinia</i>	2,6

Ces résultats montrent que des bactéries encore inconnues à ce jour, ou bien non cultivées en conditions de laboratoire, peuvent cependant être présentes sur les aliments et même en quantité élevée. Ainsi, le dogme que les communautés bactériennes de nos aliments étaient déjà connues s'est révélé faux : s'il reste vrai que la majorité des taxons trouvés sur les produits analysés étaient connus auparavant comme contaminants des aliments, certains taxons n'avaient encore jamais été décrits sur ces aliments, voire n'avaient jamais été décrits du tout. Le Tableau 1 montre également l'évolution des communautés bactériennes entre le moment de production et l'altération. Pour les 31 genres bactériens prépondérants soit à T_0 , soit à T_{alt} , on observe que certaines populations dominantes au début du procédé deviennent minoritaires à l'altération (cases en bleu clair Tableau 1) et que d'autres, non majoritaires dans la flore initiale deviennent prépondérantes dans les produits altérés (cases en mauve).

2. Les fonctions des communautés bactériennes des aliments

Parmi les bactéries présentes dans les aliments, certaines peuvent être garantes de la salubrité et d'autres s'avérer altérantes. Leurs aptitudes (comportements) dépendent des espèces, voire des

souches, du type d'aliment et des conditions rencontrées lors de la conservation des aliments. Ainsi, des espèces bactériennes, notamment parmi celles du groupe des bactéries lactiques peuvent être altérantes dans un aliment donné et au contraire protectrices dans un autre. C'est le cas par exemple de *Lactobacillus sakei* qui peut contribuer à la salubrité de la viande fraîche (Jones *et al.*, 2010 ; Chaillou *et al.*, 2014) ou altérer certains produits de la mer (Joffraud *et al.*, 2006). Inversement, *Lactococcus piscium* peut être altérant dans la viande (Andreevskaya *et al.*, 2015 ; Chaillou *et al.*, 2015) ou protecteur dans les produits de la mer (Leroi *et al.*, 2012). D'autres espèces enfin, comme *Brochothrix thermosphacta* sont connues pour être des bactéries entraînant systématiquement l'altération des produits quels qu'ils soient (Remenant *et al.*, 2015).

2.1 Flores protectrices

L'implication des ferments dans la qualité microbiologique des aliments fermentés est connue de longue date. Dans les produits carnés non fermentés, la contribution à la salubrité a également été notée pour certaines souches, appartenant généralement au groupe des bactéries lactiques. Ainsi, des souches de *L. sakei* se sont avérées efficaces contre différentes espèces pathogènes incluant *Listeria monocytogenes*, *E. coli* ou des salmonelles (Vermeiren *et al.* 2006 ; Ruby et Ingham, 2009 ; Chaillou *et al.*, 2014). Les mécanismes d'action mis en œuvre par les flores protectrices sont variés, incluant la production de composés antagonistes tels que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène ou des bactériocines, ou une compétition pour les nutriments (voir Zagorec et Christieans (2013) pour une synthèse récente). Cependant, la plupart des études qui ont été menées ne se sont focalisées que sur les souches protectrices et leurs cibles. Peu d'études ont tenu compte de l'ensemble des communautés bactériennes. Des travaux ont montré qu'un cocktail de quatre différentes souches de *L. sakei* était capable de réduire l'altération globale de carpaccio de bœuf conservé sous vide (Figure 1). Ceci se traduisait par une amélioration de l'aspect visuel du produit mais aussi par la diminution significative d'un ensemble d'espèces altérantes quantifiées par une approche moléculaire (Chaillou *et al.*, 2012).

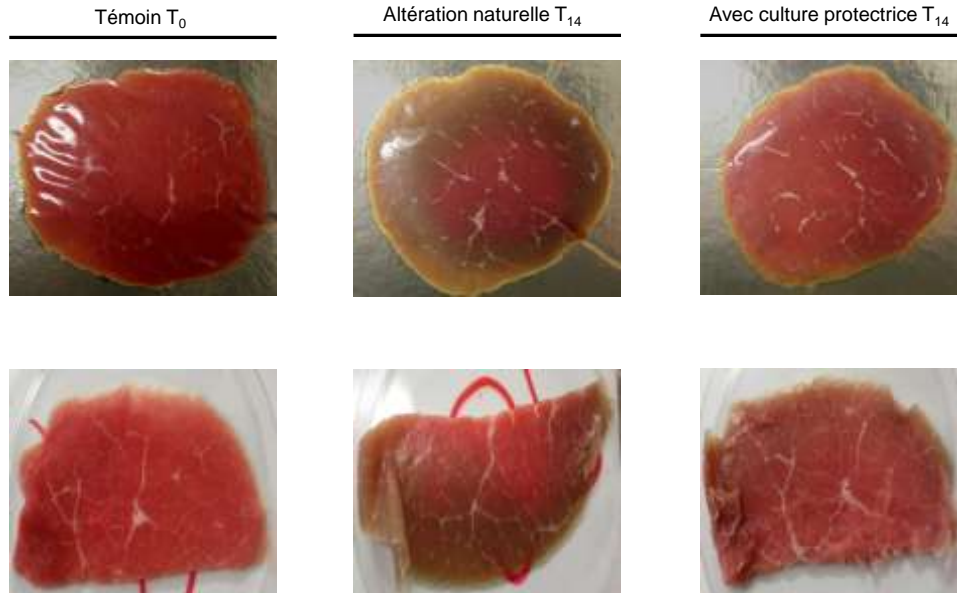


Figure 1 : Visualisation de l'effet protecteur d'un cocktail de souches protectrices de *L. sakei* sur le carpaccio de bœuf. Le carpaccio a été conservé sous vide pendant 14 jours et l'effet protecteur est visible en comparaison d'un contrôle sans ajout de cultures protectrices dont la couleur s'est altérée. Les images du haut montrent les carpaccios dans leur emballage sous vide, celles du bas après ouverture.

2.2 Flores altérantes

De nombreuses espèces ont été rapportées comme potentiellement altérantes des produits carnés. Leur métabolisme durant la conservation des aliments provoque des odeurs non souhaitées, un changement de texture ou de couleur rendant l'aliment non acceptable pour le consommateur. Dans

certains cas, notamment pour des produits conservés sous vide ou sous atmosphère protectrice, la production de gaz peut en outre entraîner le gonflement des emballages et conduire à un rejet des produits. Jusqu'à présent, il a été porté peu d'intérêt aux mécanismes exercés par les bactéries altérantes. Cependant, l'analyse des génomes de bactéries altérantes a permis de mettre en évidence le métabolisme qui en serait responsable (Andreevskaya *et al.* 2015 ; Jaaskelainen *et al.*, 2015). Quelques études se sont intéressées à l'action conjointe de plusieurs espèces et ont montré parfois comment l'action d'une espèce peut favoriser le développement d'une autre ou comment plusieurs espèces peuvent agir conjointement (Gram *et al.*, 2002 ; Laursen *et al.*, 2006). Actuellement, peu d'études concernent l'altération rapportée à des communautés bactériennes dans leur ensemble (Benson *et al.* 2014). Dans le cadre du projet ANR Ecobiopro des isolats potentiellement altérants ont été sélectionnés à partir des produits altérés et leur potentiel a ensuite été testé par inoculation sur des matrices stériles ou paucimicrobiennes. A titre d'exemple, des isolats appartenant aux cinq espèces représentant 94% des séquences identifiées à l'altération du bœuf haché, à savoir *L. piscium*, *B. thermosphacta*, *Leuconostoc carnosum*, *Lactobacillus algidus* et *Leuconostoc gasicomitatum* ont été inoculés dans de la viande hachée de bœuf conservée sous atmosphère modifiée. Une altération nette des produits a été observée après croissance de *L. piscium* et *B. thermosphacta*. Cependant les isolats de *L. piscium* qui était l'espèce majoritaire à l'altération (58% des séquences identifiées), se sont révélés comme étant les plus altérants (Christieans *et al.*, 2014). Mais pour d'autres produits comme le veau haché les espèces bactériennes majoritaires des produits altérés n'étaient pas toujours la cause de l'altération, rejetant ainsi le dogme selon lequel lorsqu'un produit est altéré, il suffit de déterminer la flore majoritaire pour en connaître la cause (Denis *et al.*, 2013 ; Christieans *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a également été montré dans certains essais, que seule la conjonction de plusieurs espèces pouvait causer de l'altération. Ces exemples montrent que l'altération est un phénomène complexe et que pour le combattre il est nécessaire de considérer les communautés bactériennes dans leur globalité plutôt que de ne considérer que des espèces ou des souches individuellement. De plus, la quantification des espèces potentiellement altérantes n'est pas non plus une solution satisfaisante puisque l'effet altérant est parfois souche dépendant et/ou dépend de la présence ou du métabolisme d'autres espèces.

3. La biopréservation et les flores protectrices

Le terme de biopréservation provient de l'anglais *biopreservation* dont Stiles a donné en 1996 la définition suivante : « Biopreservation refers to extended storage life and enhanced safety of foods using the natural microflora and (or) their antibacterial products » (Stiles, 1996). Le fait d'utiliser une flore protectrice qui va lutter contre les flores indésirables, tout en préservant les qualités organoleptiques du produit fini entre dans les stratégies envisagées comme technologie de barrière. De nombreuses études se sont focalisées sur la lutte contre les bactéries pathogènes, avec le développement notamment de bactéries productrices de bactériocines à spectre d'action relativement limité (la plupart sont utilisées pour lutter contre *Listeria monocytogenes*). Plus récemment, la lutte contre l'altération à l'aide de la biopréservation a également été envisagée (voir Zagorec et Christieans, 2013 pour une synthèse récente).

3.1 Rôle et fonctionnement des flores protectrices

Dans le cadre du projet Ecobiopro des cultures protectrices déjà connues et sélectionnées pour leur action sur des cibles spécifiques ont été testées dans les produits naturellement contaminés afin d'étudier leur impact sur l'ensemble de la flore et non pas uniquement sur les espèces cibles. Différents cas de figure ont été notés. Ainsi il a pu être observé un retard d'apparition de l'altération sans possibilité de faire de corrélation avec l'inhibition d'une espèce d'altération spécifique. Ou bien la limitation de l'altération était corrélée avec l'inhibition de la flore d'altération. A l'inverse il a pu être observé une inhibition de la flore d'altération mais pas de l'altération sensorielle, ou bien une limitation de l'altération sensorielle sans inhibition du développement de la flore d'altération. Il est donc difficile de

prévoir l'effet d'une culture protectrice et encore plus de transposer cet effet observé dans un produit alimentaire à un autre produit.

Comprendre les fonctions exprimées et les mécanismes impliqués dans l'action de biopréservation est un enjeu important si l'on veut développer ces pratiques. On a vu qu'il est difficile de raisonner souche à souche et que les approches globales sont préférables pour mieux appréhender ces phénomènes. Cependant peu de ce type d'études ont encore été développées. Récemment des travaux sur un cocktail de quatre souches de *L. sakei* protectrices qui étaient capables de limiter l'altération du carpaccio de bœuf (voir plus haut), ont révélé que les gènes exprimés par le cocktail étaient différents selon que le produit était altéré ou non (Chaillou *et al.*, 2015).

3.2 Contraintes et réglementation

Dans le cadre du réseau mixte technologique (RMT) FLOREPRO, labellisé depuis 2009 et sous l'égide de l'ACTIA, un panel d'experts a formé un consortium autour de la thématique de l'utilisation des flores protectrices pour améliorer la conservation des denrées alimentaires. Parmi les différents objectifs fixés par le consortium, l'un consiste à mener une réflexion sur la difficulté réglementaire liée à l'absence d'une définition claire du statut légal des cultures protectrices. En effet, à l'inverse des produits fermentés, ce n'est qu'au cours des dernières décennies que des études scientifiques ont mis en évidence le potentiel protecteur de certains microorganismes, naturellement présents sur les aliments (frais ou peu transformés), contre des bactéries pathogènes ou altérantes. Une utilisation non traditionnelle des cultures dans l'industrie alimentaire, dans l'unique but d'exercer un effet conservateur sur l'aliment, soulève la question du statut et de la sécurité de ces cultures. A cette difficulté réglementaire, s'ajoute une deuxième contrainte en lien avec le respect des critères microbiologiques réglementaires dans la mesure où l'apport d'une culture dans une denrée alimentaire engendre forcément un dépassement du critère « flore totale » préconisé (règlement CE 2073/2005, cahier des charges de la FCD, GBPH).

Dans ce contexte, les membres du réseau ont souhaité apporter une contribution à travers la rédaction d'un chapitre d'ouvrage (Zagorec et Christieans, 2013) et d'un guide de recommandations. Le chapitre d'ouvrage fait le constat de la difficulté à positionner les cultures protectrices dans les dénominations actuelles pour l'étiquetage des denrées alimentaires ou à identifier dans les définitions existantes, celle qui soit adaptée aux différents usages que l'on attend de cette application. Le guide de recommandations élaboré par le RMT a pour objectif d'aider les professionnels à identifier les critères nécessaires à l'élaboration d'un dossier de demande d'autorisation d'utilisation d'une culture à des fins de biopréservation. Ce guide intitulé « Recommandations du RMT – ACTIA – FLOREPRO pour l'usage des cultures protectrices » fournit la démarche à suivre et les principaux critères à respecter en cas d'une demande d'autorisation (Denis *et al.*, 2015). Ce guide constitue une base disponible pour les pouvoirs publics en cas de saisine au niveau de la France ou de l'Europe. Toutefois, il est important de préciser qu'à la fin de l'année 2014, la Commission Européenne a mis le statut des cultures protectrices à l'ordre du jour. Il est en effet souhaitable que la réglementation évolue, afin d'être conforme aux attentes et/ou aux obligations des législateurs, des consommateurs et des industriels de différentes filières, qu'ils soient producteurs de ferments ou producteurs d'aliments.

Références bibliographiques

Andreevskaya M., Johansson P., Laine P., Smolander O.P., Sonck M., Rahkila R., Jääskeläinen E., Paulin L., Auvinen P., Björkroth J., 2015. Genome sequence and transcriptome analysis of meat spoilage lactic acid bacterium *Lactococcus piscium* MKFS47. Applied and Environmental Microbiology. In press.

Benson A.K., David J.R.D., Evans Gilbreth S., Smith G., Nietfeldt J., Legge R., Kim J., Sinha R., Duncan C.E., Ma J., Singh I., 2014. Microbial successions are associated with changes in chemical

profiles of a model refrigerated fresh pork sausage during an 80-day shelf-life study. *Applied and Environmental Microbiology*. 80, 5178-5194.

Chaillou S., Christieans S., Rivollier M., Lucquin I., Champomier-Vergès M.C., Zagorec M., 2014. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science* 94, 332-338.

Chaillou S., Chaulot-Talmon A., Caekebeke H., Cardinal M., Christieans S., Denis C., Desmonts M.H., Dousset X., Feurer C., Hamon E., Joffraud J.-J., La Carbona S., Leroi F., Leroy S., Lorre S., Macé S., Pilet M.-F., Prévost H., Rivollier M., Roux D., Talon R., Zagorec M., Champomier-Vergès M.-C., 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal* 9, 1105-1118.

Chaillou S., Champomier-Vergès M.C., Zagorec M., 2012. Composition comprenant au moins trois souches différentes de *Lactobacillus sakei* pour la conservation de produits comestibles. Brevet. Demande française N° 1257785. Extension PCT N° PCT/EP2013/066886.

Chaillou S., Guillou S., Coeuret G., Zagorec M., Membré J.M., Champomier-Vergès M.C., 2015. Quantitative analysis of differential gene expression in RNA-sequencing data for the investigation of the bioprotective effect of *Lactobacillus sakei* in beef carpaccios. 9th International Conference on Predictive Modelling in Food, Rio de Janeiro.

Christieans S., Chaillou S., Chacornac J.P., Champomier-Vergès M.C., Chaulot-Talmon A., Talon R., Zagorec M., Leroy S., 2014. Which bacteria cause beef burger deterioration? A new approach. *Proceedings of FoodMicro*, 24th International ICFMH Conference, Nantes.

Denis C., La Carbona S., Chaillou S., Christieans S., Desmonts M.-H., Zagorec M., Champomier-Vergès M.C., 2013. Spoilage microbial ecosystem of veal meat. *Proceedings of Microbial spoilers in food*, Quimper.

Denis C., Champomier-Vergès M.C., Feurer C., Hamon E., Leroi F., Pilet M.F., Talon R., Zagorec M., Daube G., Delbès C., Fraud S., Irlinger F., Lefur B., Leroy S., Achi-Barnouin T., Christieans S., 2015. Recommandations du RMT –ACTIA– FLOREPRO pour « l'usage des cultures protectrices » Document rédigé par le consortium FLOREPRO Pilotage : Catherine Denis (ACTALIA).

European Commission, 2005. Regulation (EC) n° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338,1–26.

Gram L., Ravn L., Rasch M., Bruhn J.B., Christensen A.B., Givskov M., 2002. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. *International journal of Food Microbiology*. 78, 79-97.

Jaaskelainen E., Vesterinen S., Parshintsev J., Johansson P., Riekkola M. L., Bjorkroth J., 2015. Production of butyryl-odor compounds and transcriptome response in *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* LMG18811T during growth on various carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 1902-1908.

Joffraud J.J., Cardinal M., Cornet J., Chasles J.S, Léon S., Gigout F., Leroi F., 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. 112, 51-61.

Jones R.J., Wilklund E., Zagorec M., Tagg J.R., 2010. Evaluation of stored lamb bio-preserved using a three-strain cocktail of *Lactobacillus sakei*. *Meat Science*. 86, 955-959.

Laursen B.G., Leisner J.J., Dalgaard P., 2006. *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 3604-3611.

Leroi F., Fall P.A., Pilet M.F., Chevalier F., Baron R., 2011. Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Microbiology*. 31, 222-228.

Remenant B., Jaffrès E., Dousset X., Pilet M.-F., Zagorec M., 2015. Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*. 45, 45-53.

Renault P., Zagorec M., Champomier-Vergès M.C., 2015. Communautés microbiennes des aliments. In Champomier-Vergès et Zagorec (Coord) : La métagénomique – Développements et futures applications. Editions Quae. pp. 57-70.

Rouger A., Remenant B., Prévost H. Zagorec M., 2015. Deciphering bacterial diversity and ecological interactions on poultry meat to improve food quality and safety. Proceedings of XXII European symposium on the quality of poultry meat. Nantes.

Ruby J.R., Ingham S.C., 2009. Evaluation of potential for inhibition of growth of *Escherichia coli* O157:H7 and multidrug-resistant *Salmonella* serovars in raw beef by addition of a presumptive *Lactobacillus sakei* ground beef isolate. Journal of Food protection. 72, 251-259.

Stiles M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70, 331-345.

Vermeiren L., Devlieghere F., Vandekinderen I., Debevere J., 2006. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. Food Microbiology. 23, 511-518.

Zagorec M., Christeans S. (Coord.), 2013. Flores protectrices pour la conservation des aliments. Editions Quae. 147 pages.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)