

Pour des aliments sains :

Savoir maîtriser les risques en alimentation

► Mercredi 28 novembre 2012



Écosystèmes microbiens et préservation des aliments

Monique Zagorec, INRA, UMR1014 Secalim, Nantes

M.C. Champomier-Vergès, INRA, UMR1319 Micalis, Jouy en Josas

P. Renault, INRA, UMR1319 Micalis, Jouy en Josas

Y. Le Loir, INRA, UMR1253 STLO, Rennes

F. Valence, INRA, UMR1253 STLO, Rennes

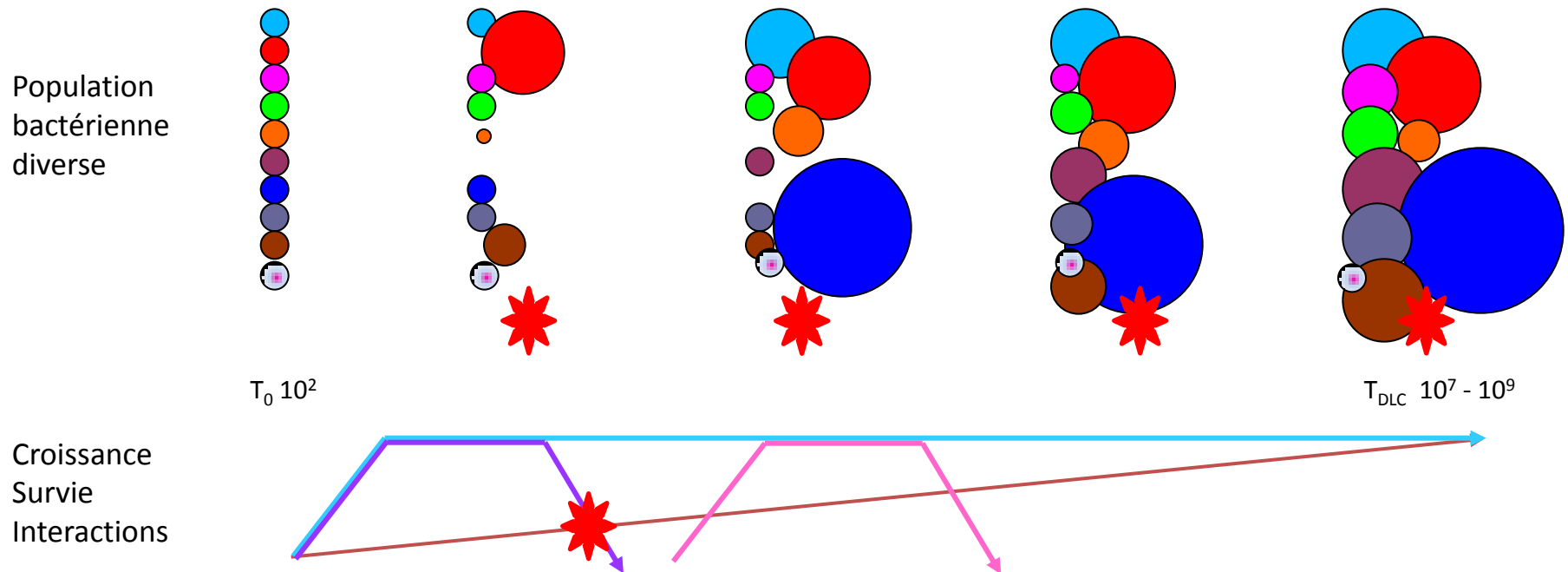
M.C. Montel, INRA, URF545, Aurillac

- Écosystèmes microbiens des aliments et biopréservation
- Conservation de la biodiversité microbienne des aliments : rôle des Centres de Ressources Biologiques
- Diversité bactérienne au sein des aliments, apport des approches métagénomiques
- Interactions microbiennes au sein des produits laitiers et biopréservation
- Interactions microbiennes au sein des produits carnés et biopréservation
- Conclusion

Introduction : écosystèmes microbiens des aliments et
biopréservation



Introduction : écosystèmes microbiens des aliments et biopréservation

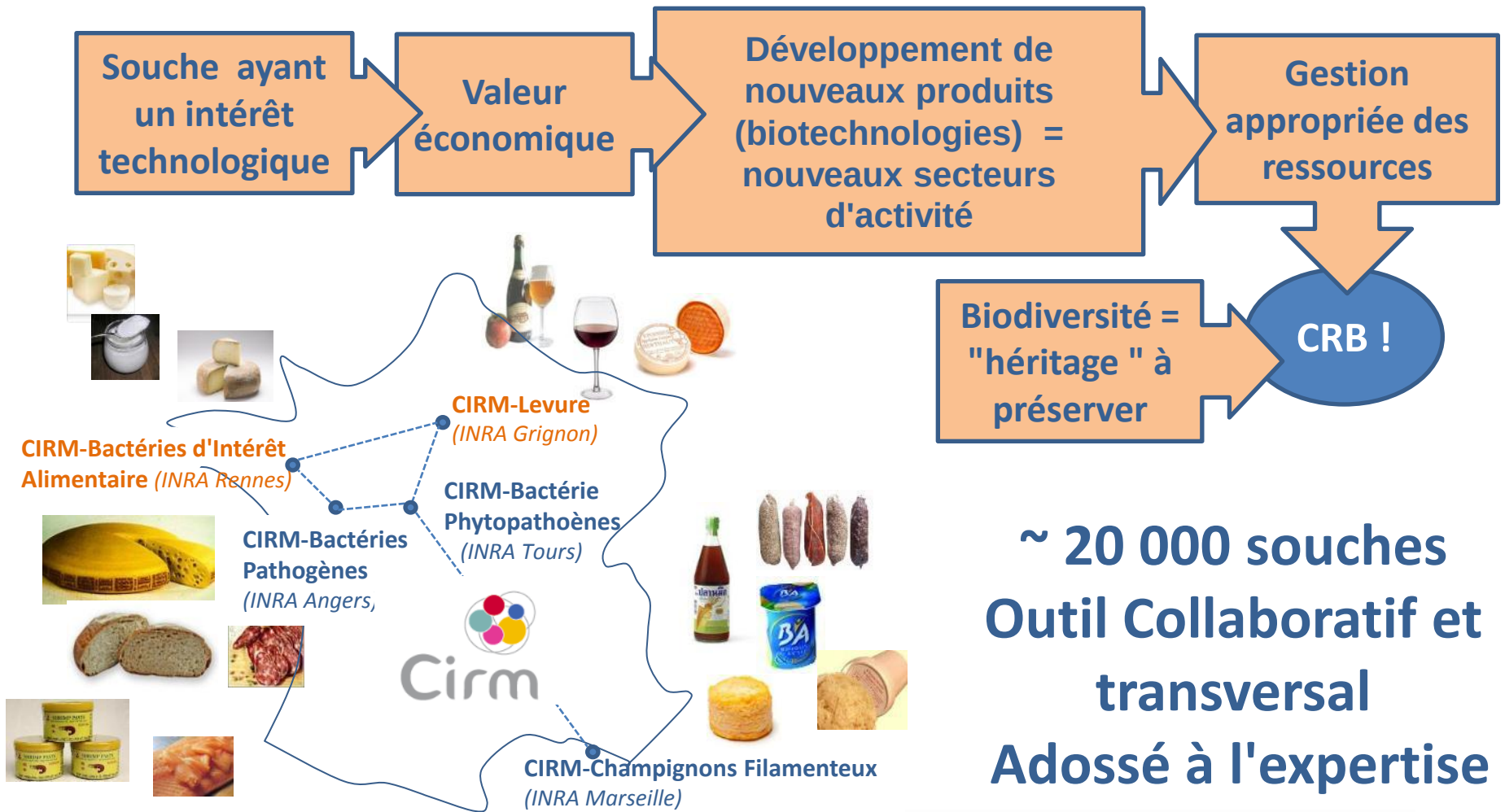


- Maîtriser l'écosystème au cours de la transformation/conservation
- Décrire, comprendre, modéliser, prédire

Conservation de la biodiversité microbienne des aliments :
rôle des Centres de Ressources Biologiques

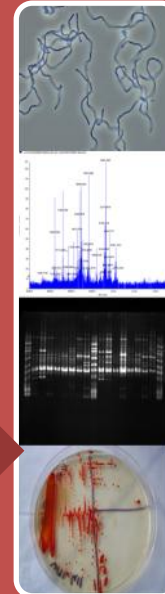
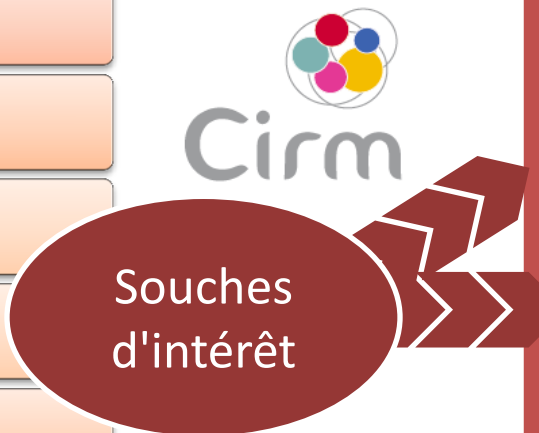
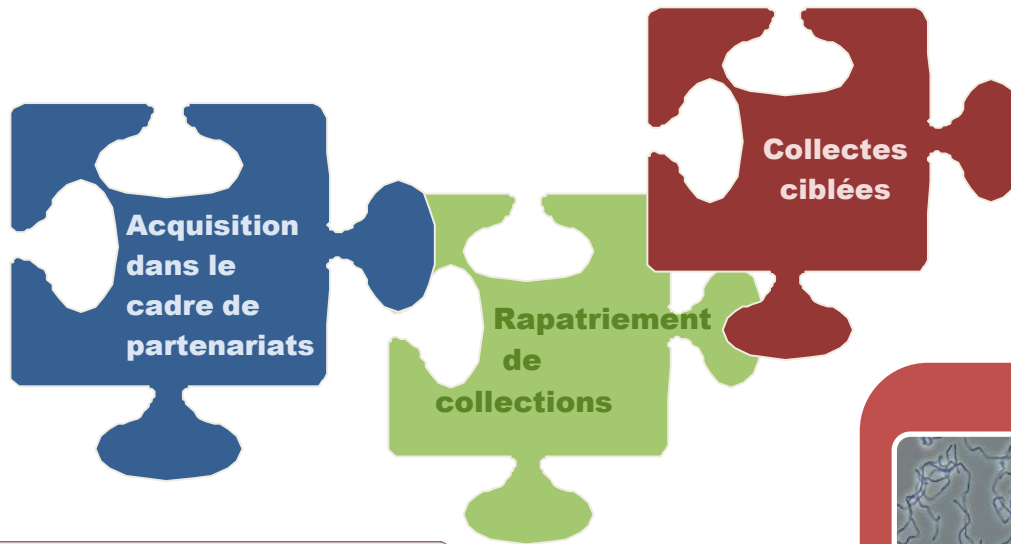


La préservation des ressources biologiques : Le CIRM, 5 sites thématiques organisés en réseau



~ 20 000 souches
Outil Collaboratif et transversal
Adossé à l'expertise

Origine des ressources biologiques et missions du CIRM

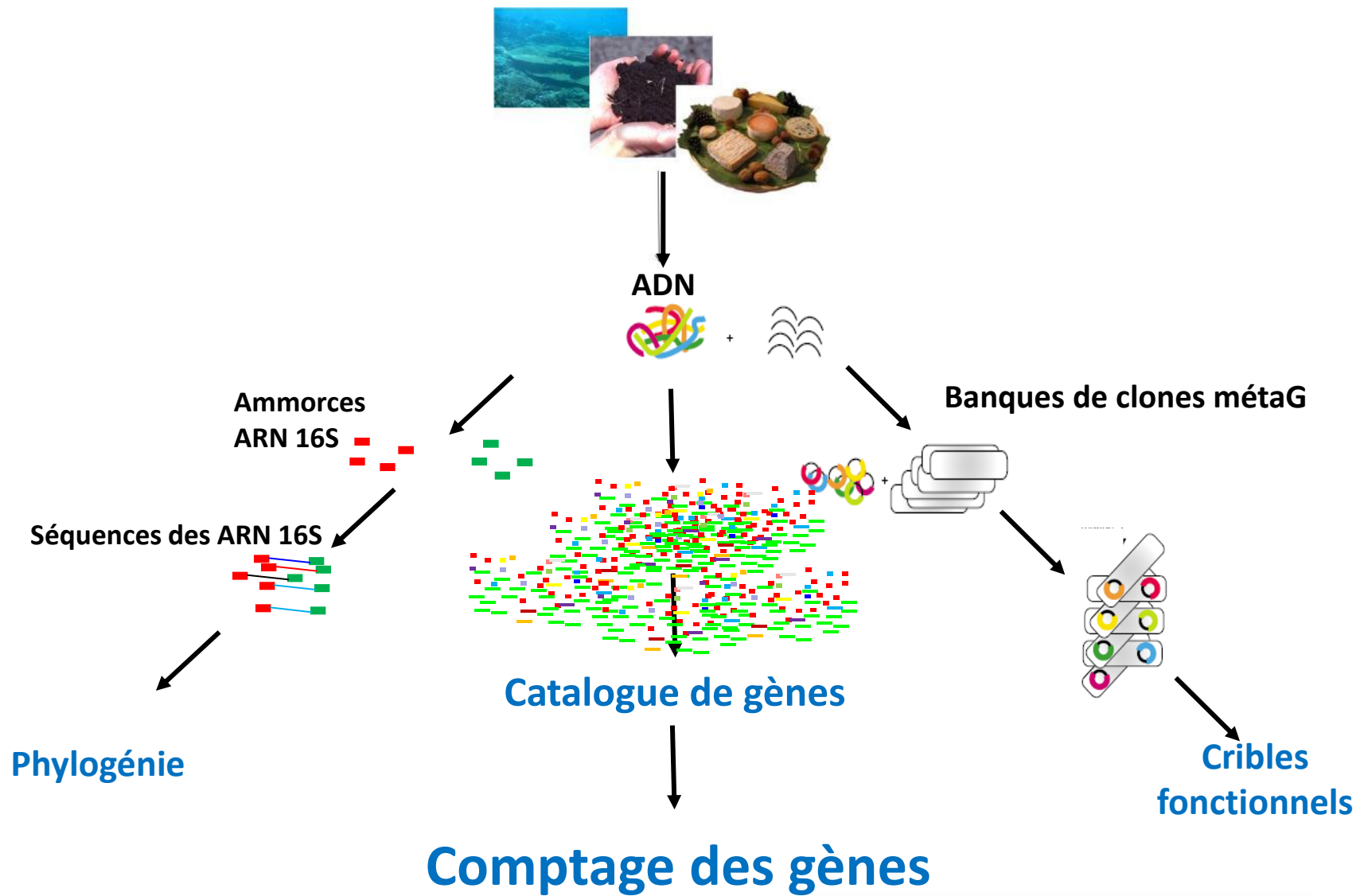


Préservation et exploration de la biodiversité microbienne pour :

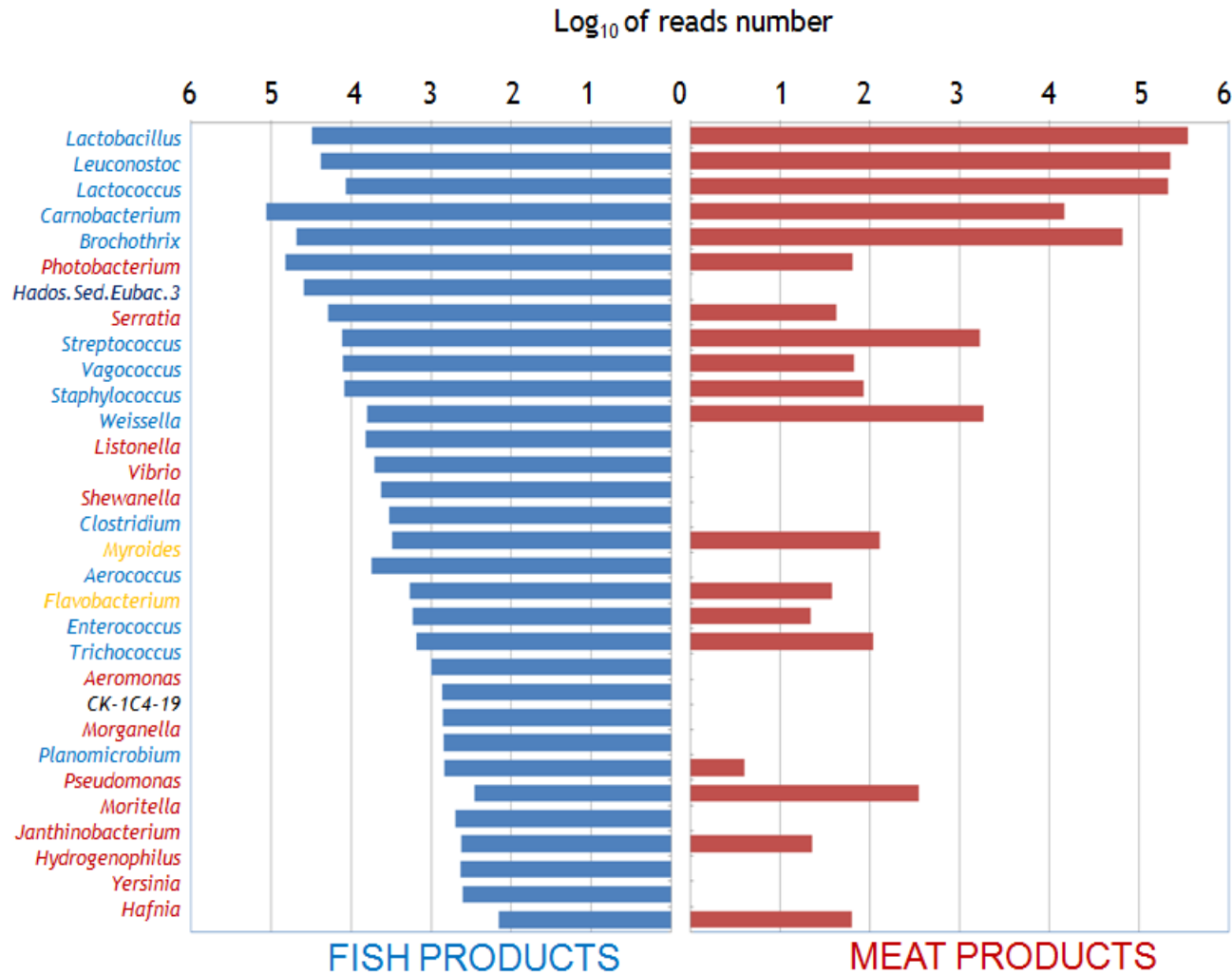
- 👉 les laboratoires de recherche INRA
- 👉 les partenaires académiques et industriels

- Diversité bactérienne au sein des aliments, apport des approches métagénomiques





Caractériser les flores majoritaires de l'altération



Projet ANR ECOBIOPRO

2011-2013



INRA



Financé par
ANR

CARREFOURS
DE L'INNOVATION AGRONOMIQUE

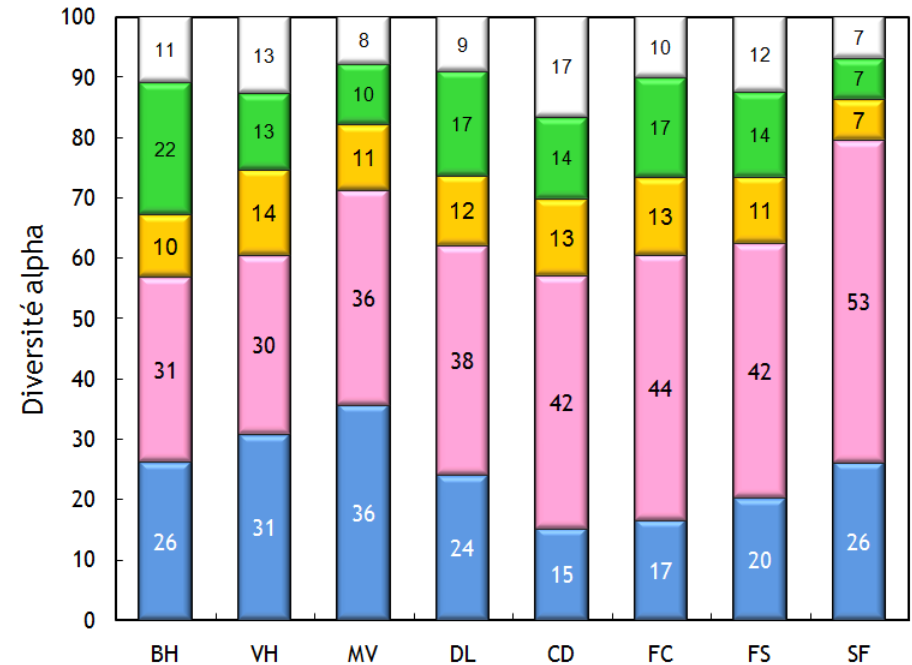


Caractériser l'écosystème de produits non fermentés

Comparaison abondance & diversité des phylums à T_0



$n_{\text{taxon}} = 485 \quad 451 \quad 129 \quad 578 \quad \underline{862} \quad 477 \quad 604 \quad \underline{88}$



Projet ANR ECOBIOPRO

2011-2013



INRA



Financé par
ANR

CARREFOURS
DE L'INNOVATION AGRONOMIQUE

« Top60 » d'abondance parmi 40 fromages étudiés

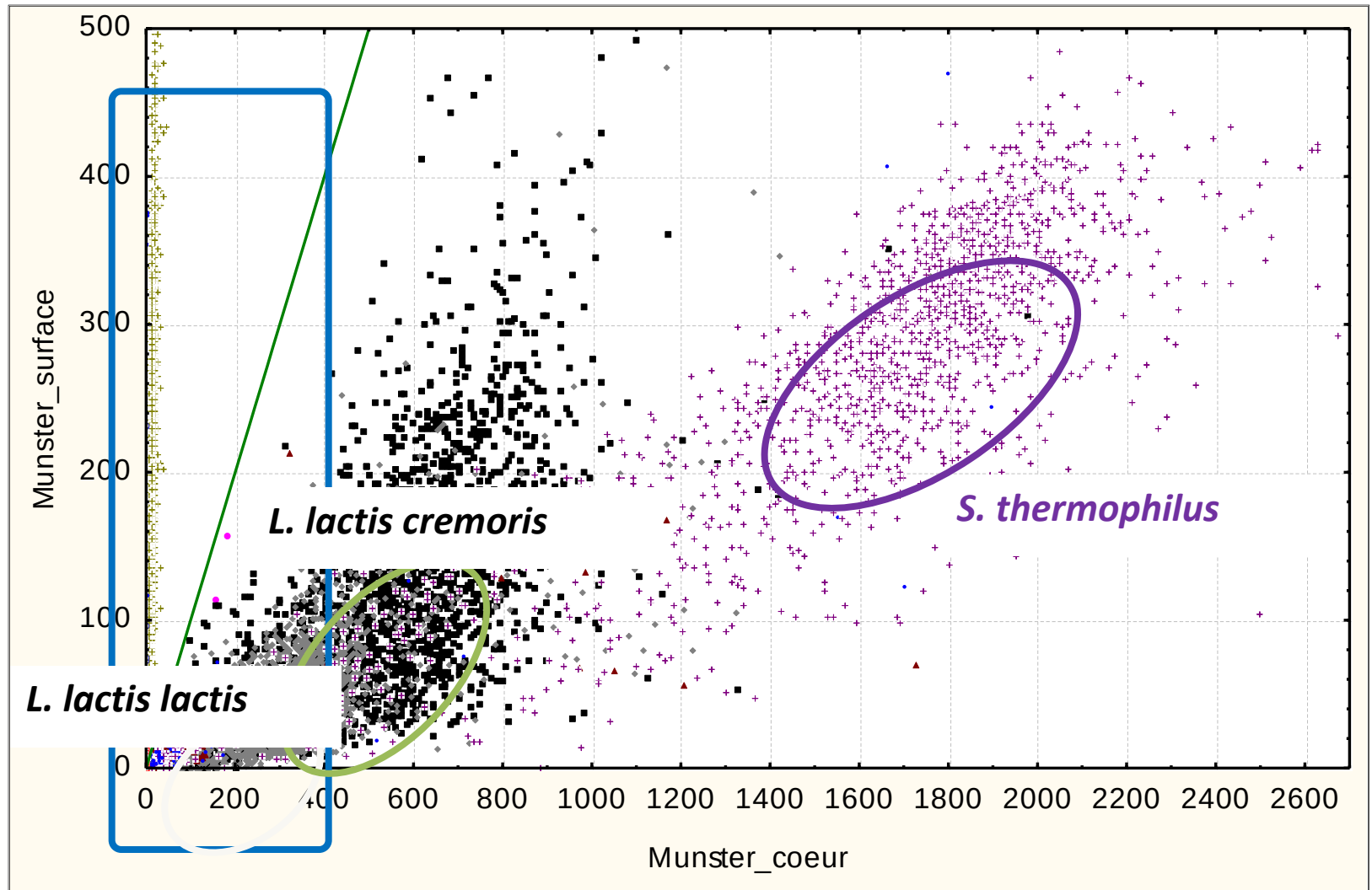
specie	Bleu_de_Ge.Comte_coeu	Gorgonzola	Gorgonzola_Beaufort	Suizo
Lactococcus lactis subsp. cremori	691,95	223,12	9,61	38,45
Lactobacillus delbrueckii subsp. 1	1,02	72,44	564,69	2111,57
Psychrobacter aquimaris ER15_11	0,58	2,04	0,15	0,06
Streptococcus thermophilus LMC	43,00	1201,02	85,45	909,85
Corynebacterium variabile DSM 4	1,12	3,29	0,20	0,46
Arthrobacter bergerei Ca106	0,28	0,79	1,96	1,29
Brevibacterium linens BL2	4,19	10,28	2,34	1,14
Lactococcus lactis subsp. lactis II1	590,85	69,52	5,25	4,36
Psychrobacter immobilis PG1	2,82	10,00	0,09	0,05
Pseudoalteromonas halo planktis	0,79	2,86	1,87	0,47
Penicillium camemberti	9,55	12,92	16,31	11,27
Geotrichum candidum	5,24	5,28	1,96	3,37
Leuconostoc citreum LBAE E16	317,39	25,03	0,66	0,18
Lactobacillus casei ATCC 334	45,30	284,34	0,09	1,60
Weissella confusa LBAE C39-2	199,57	169,02	69,35	284,08
Streptococcus macedonicus ACA-	42,50	36,11	4,95	22,15
Psychrobacter celer 91	0,31	0,40	0,47	0,54
Listeriaeae bacterium TTU M1-0	11,35	8,38	0,37	0,40
Halomonas sp. 1M45	0,39	1,48	0,94	0,24
Brevibacterium laterosporus GI-9	192,78	146,86	58,37	229,32
Pediococcus pentosaceus IE-3	121,00	16,20	60,02	218,80
Escherichia coli XH001	27,98	16,00	0,78	0,81
Penicillium roquefortii	98,41	6,15	139,57	213,76
Lactococcus raffinolactis V4	49,28	13,89	1,16	7,16
Lactobacillus casei str. Zhang	34,36	208,99	0,43	1,03
Arthrobacter arilaitensis Re117	6,32	22,71	0,55	0,31
Prevotella micans F0438	26,47	37,13	8,29	48,92
Lactobacillus casei RD-II	37,36	197,95	1,56	5,42
Lactobacillus paracasei subsp. pa	31,40	184,50	0,42	0,61
Arthrobacter celer 91	4,94	17,62	0,22	0,08
Arthrobacter arilaitensis 3M03	4,62	16,60	0,24	0,10
Brevibacterium antiquum CNR29	0,91	2,25	0,52	0,25
Gemmata obscuriglobus UQM 22	17,24	9,87	0,48	0,50
Leuconostoc mesenteroides sub	3,18	5,35	0,23	1,39
Brachy bacterium alimentarium C	0,25	0,50	0,34	0,08
Dysgonomonas gadei ATCC BAA-	8,43	8,80	13,33	6,99
Psychrobacter faecalis CIP 10611	0,14	0,46	0,08	0,05
Corynebacterium casei UCMA 38	0,71	2,09	0,59	0,34
Catenibacterium mitsuokai DSM	12,86	21,43	3,43	32,38
Leuconostoc lactis 1283	10,78	5,46	0,12	0,13
Corynebacterium ammoniogene	0,62	1,81	0,52	0,32
Riemerella anatipestifer ATCC 11	12,95	17,91	4,19	24,30
Eubacterium hallii DSM 3353	11,96	19,08	3,32	32,98
Desulfovibrio sp. 6_1_46AFAA	7,36	7,60	11,42	6,18
Lactobacillus helveticus DPC 457	4,27	90,92	18,03	50,99
Selenomonas artemidis F0399	0,08	0,13	0,55	0,09
Scopulariopsis flava FM069	0,41	0,36	0,06	0,13
Bacillus cereus R309803	11,07	18,32	3,08	29,67
Halomonas sp. 3F2F	0,22	0,22	0,27	0,28
Halomonas alkaphila 3A7M	0,06	0,19	0,11	0,04
Halomonas venusta 3D7M	0,04	0,15	0,08	0,02
Sphaerochaeta coccoides DSM 17	6,09	6,17	9,38	5,16
Raoultella terrigena Pi19	0,02	0,02	0,00	0,01
Debaryomyces hansenii CBS767	0,71	1,61	2,31	0,82
Lactococcus garvieae Lg2	39,01	6,43	0,38	0,63
Microbacterium gubbeenense M	0,41	0,79	0,35	0,25
Shigella sonnei 53G	1,52	3,08	0,03	0,00
Psychrobacter namhaensis 1439	0,11	0,41	0,07	0,04
Serratia liquefaciens 1B4F	0,05	0,12	0,02	0,03
Prevotella oulorum F0390	7,16	10,02	2,23	13,46
Klebsiella oxytoca 10-5246	0,06	0,10	0,01	0,01
Psychrobacter arcticus 273-4	0,08	0,28	0,06	0,04
Psychrobacter cryohalolentis K5	0,09	0,32	0,03	0,03

Lactococcus lactis subsp. cremori	2958
Lactobacillus delbrueckii subsp. 1	2112
Psychrobacter aquimaris ER15_11	1359
Streptococcus thermophilus LMC	1201
Corynebacterium variabile DSM 4	1162
Arthrobacter bergerei Ca106	852
Brevibacterium linens BL2	746
Lactococcus lactis subsp. lactis II1	591
Psychrobacter immobilis PG1	577
Pseudoalteromonas halo planktis	437
Penicillium camemberti	429
Geotrichum candidum	371
Leuconostoc citreum LBAE E16	317
Lactobacillus casei ATCC 334	284
Weissella confusa LBAE C39-2	284
Streptococcus macedonicus ACA-	282
Psychrobacter celer 91	275
Listeriaeae bacterium TTU M1-0	272
Halomonas sp. 1M45	268
Brevibacterium laterosporus GI-9	239
Pediococcus pentosaceus IE-3	219
Escherichia coli XH001	216
Penicillium roquefortii	214
Lactococcus raffinolactis V4	214
Lactobacillus casei str. Zhang	209
Arthrobacter arilaitensis Re117	207
Prevotella micans F0438	198
Lactobacillus paracasei subsp. pa	184
Brevibacterium antiquum CNR29	142
Gemmata obscuriglobus UQM 22	132

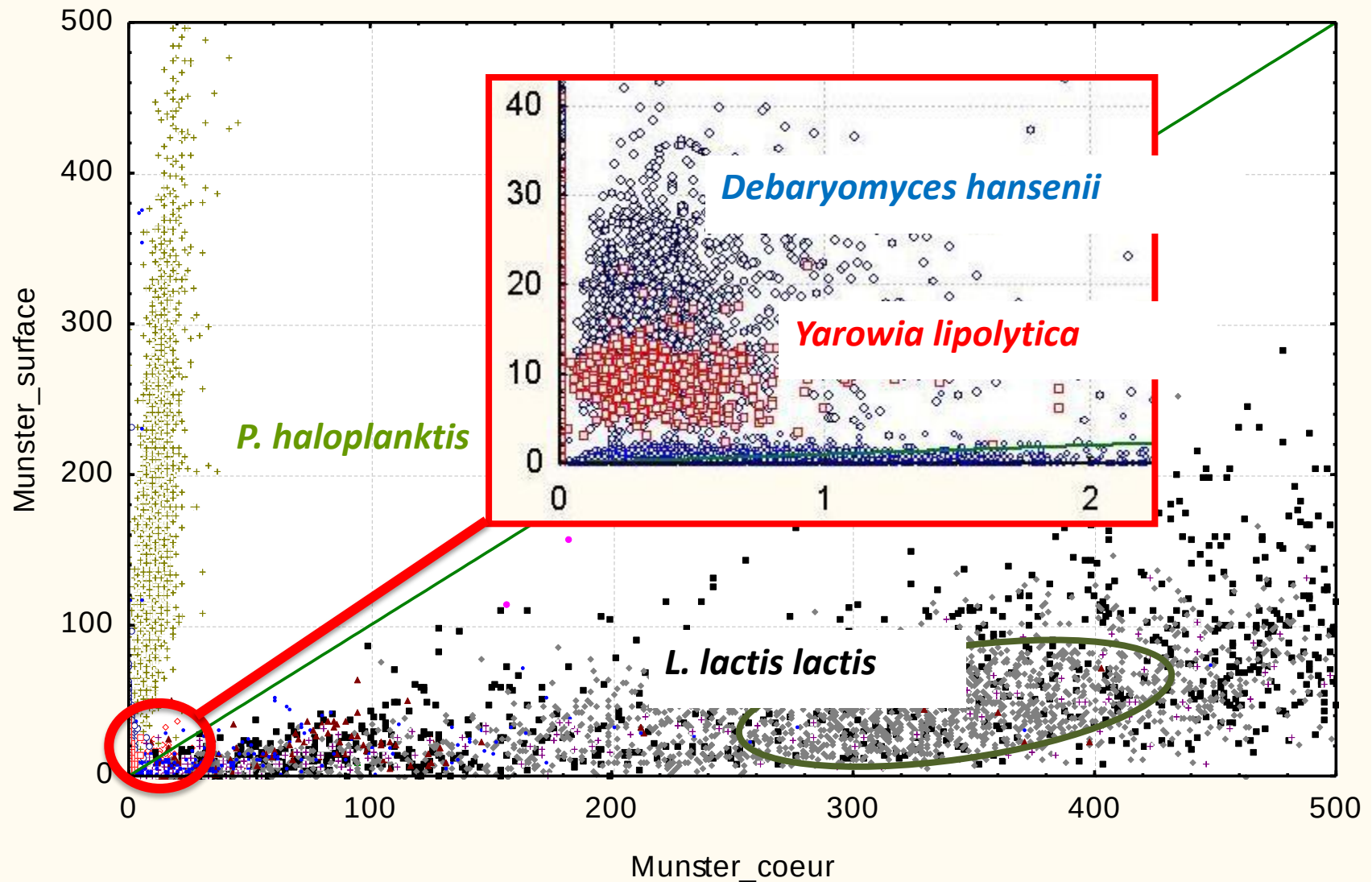
Leuconostoc mesenteroides sub	117
Brachy bacterium alimentarium C	110
Dysgonomonas gadei ATCC BAA-	107
Psychrobacter faecalis CIP 10611	106
Corynebacterium casei UCMA 38	106
Catenibacterium mitsuokai DSM	98
Leuconostoc lactis 1283	98
Corynebacterium ammoniogene	97
Riemerella anatipestifer ATCC 11	97
Eubacterium hallii DSM 3353	95
Desulfovibrio sp. 6_1_46AFAA	91
Lactobacillus helveticus DPC 457	91
Selenomonas artemidis F0399	91
Scopulariopsis flava FM069	88
Bacillus cereus R309803	85
Halomonas sp. 3F2F	84
Halomonas alkaphila 3A7M	83
Halomonas venusta 3D7M	77
Sphaerochaeta coccoides DSM 17	75
Raoultella terrigena Pi19	68
Debaryomyces hansenii CBS767	66
Lactococcus garvieae Lg2	64
Microbacterium gubbeenense M	58
Shigella sonnei 53G	57
Psychrobacter namhaensis 1439	56
Serratia liquefaciens 1B4F	55
Prevotella oulorum F0390	54
Klebsiella oxytoca 10-5246	54
Psychrobacter arcticus 273-4	53
Psychrobacter cryohalolentis K5	53

Actai Salers_surfa_Tome_des_8Tomme_de_Toscanello_surface	5,95	237,83	229,45	326,18	351,46	2958,19
	2,35	15,34	45,08	13,81	9,56	2111,57
	8,51	24,38	33,42	22,25	18,57	1358,51
	3,94	43,47	64,37	62,90	34,42	1201,02
	1,11	1,24	6,47	11,73	0,38	1161,81
	6,57	2,29	5,66	3,38	1,67	851,85
	3,87	169,13	745,56	489,80	44,25	745,56
	8,85	44,68	39,98	60,68	69,16	590,85
	5,74	10,42	22,19	11,97	7,88	576,74
	8,89	2,63	5,54	0,82	2,03	437,31
	8,14	1,39	1,13	12,59	17,62	429,16
	2,10	1,94	2,15	1,83	1,40	370,87
	2,74	5,84	4,13	4,53	7,45	317,39
	2,69	1,30	7,40	1,45	2,06	284,34
	1,28	27,61	41,75	41,54	36,36	284,08
	2,76	10,64	9,23	14,56	14,14	282,00
	3,77	5,89	3,68	27,62	3,24	275,02
	6,99	6,18	7,90	9,56	8,67	271,61
	0,84	0,12	1,88	2,77	0,94	267,88
	3,31	28,40	45,31	44,25	35,22	239,32
	0,24	19,37	34,08	32,27	28,25	218,80
	15,55	14,41	16,87	20,50	19,02	215,73
	2,11	0,81	0,64	1,81	5,69	213,76
	16,64	20,30	20,61	21,71	19,78	213,67
	2,74	1,04	5,04	1,16	1,59	208,99
	9,46	7,18	48,00	62,44	3,83	206,90
	1,08	16,21	20,43	17,71	13,73	198,08
	3,42	1,21	5,28	1,61	1,41	197,95
	1,92	0,99	4,52	1,02	0,81	184,50
	1,47	4,24	37,07	47,94	2,78	160,57
	4,08	5,12	36,74	47,64	2,75	154,98
	14,87	34,81	141,58	89,55	21,55	141,58
	2,85	8,91	10,42	12,74	11,81	132,47
	4,31	2,17	2,19	2,00	2,85	117,43
	4,80	24,13	64,51	110,19	4,37	110,19
	9,01	15,46	10,33	21,86	6,23	107,05
	1,91	3,42	4,50	106,32	2,10	106,32
	2,21	6,34	79,20	15,14	1,08	105,80
	1,46	4,08	4,43	1,53	8,28	98,46
	4,36	2,31	2,58	2,82	3,56	97,82
	0,80	1,38	72,60	9,83	0,85	97,48
	7,02	7,61	9,92	8,73	6,87	97,02
	3,77	4,02	4,30	1,45	7,81	94,77
	7,67	13,18	8,86	18,62	5,39	90,96
	3,63	1,18	1,62	1,03	37,19	90,92
	0,08	0,06	0,05	0,10	0,25	90,80
	1,57	8,48	53,09	87,99	21,85	87,99
	5,11	3,50	3,80	1,31	7,65	85,11
	0,65	0,22	0,66	1,77	1,48	84,33
	0,42	0,13	0,37	0,73	1,21	83,23
	5,34	0,03	0,15	0,26	0,56	77,13
	6,25	10,76	7,23	15,20	4,44	74,59
	1,07	0,78	0,71	0,31	0,82	68,04
	1,93	2,72	2,38	1,82	8,76	66,48
	0,28	7,70	6,52	8,78	9,76	64,45
	1,51	1,89	32,85	4,30	0,84	57,70
	0,68	1,63	8,38	0,91	1,46	57,42
	5,62	1,21	1,71	9,63	0,90	55,62
	5,49	1,20	45,07	0,42	1,13	54,64
	4,39	4,39	5,49	4,72	3,73	54,39
	2,73	1,05	1,07	0,66	1,12	53,84
	3,34	1,19	1,58	9,72	0,85	53,34
	1,29	1,12	1,68	8,63	0,85	53,29

Voir les gènes du Munster



Voir les gènes du Munster



Interactions microbiennes au sein des produits laitiers et biopréservation

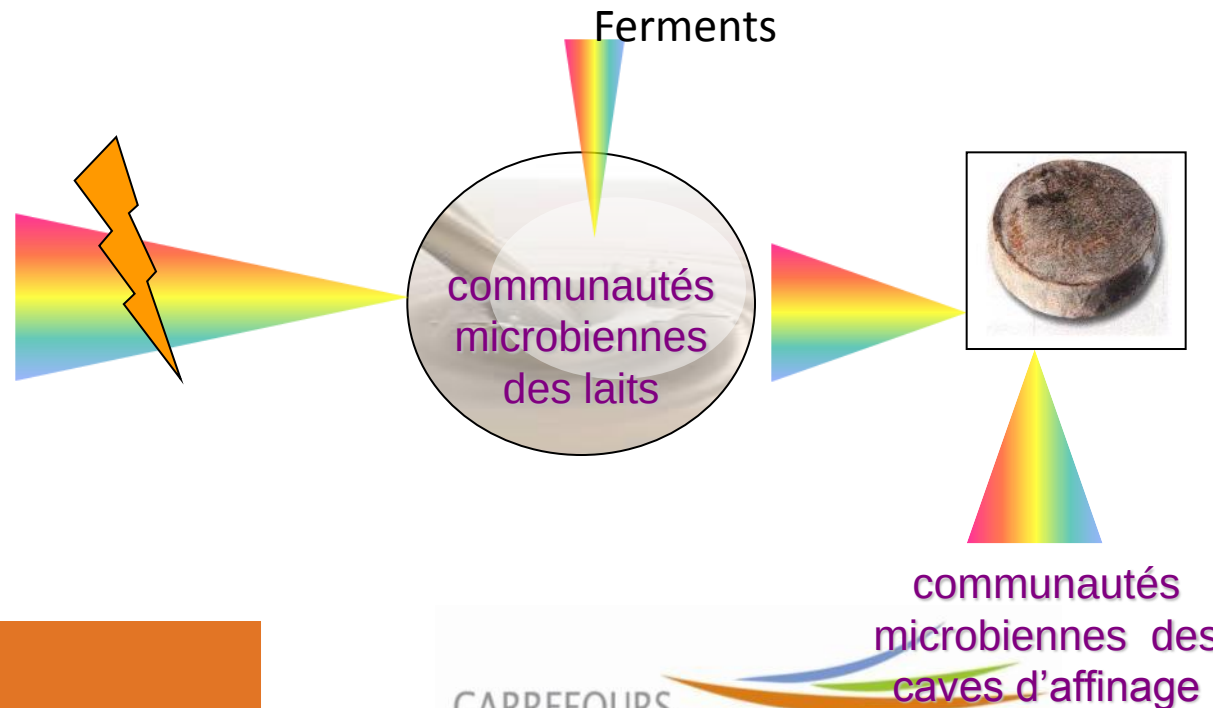
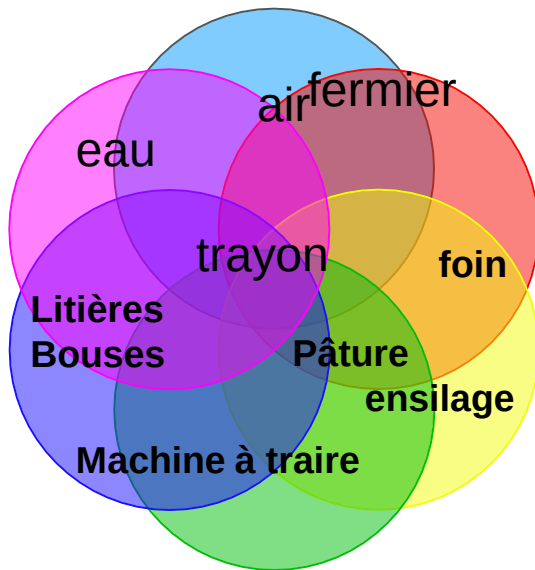


Les fromages aux communautés microbiennes complexes : des produits auto-biopréservés

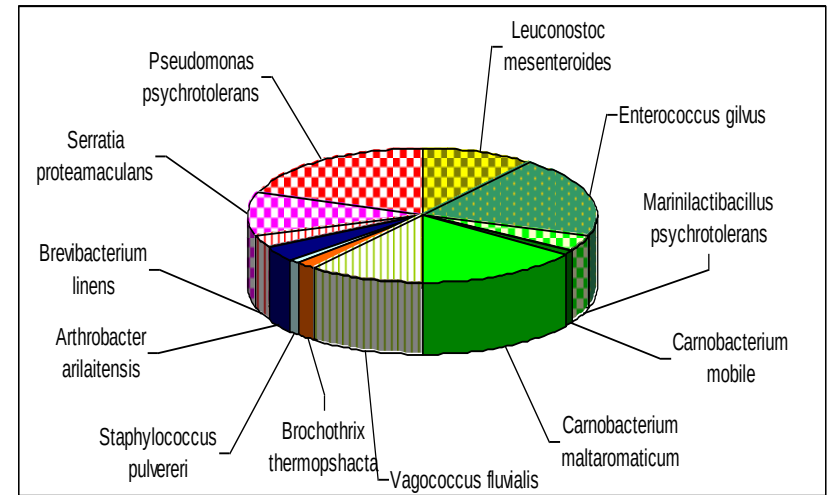
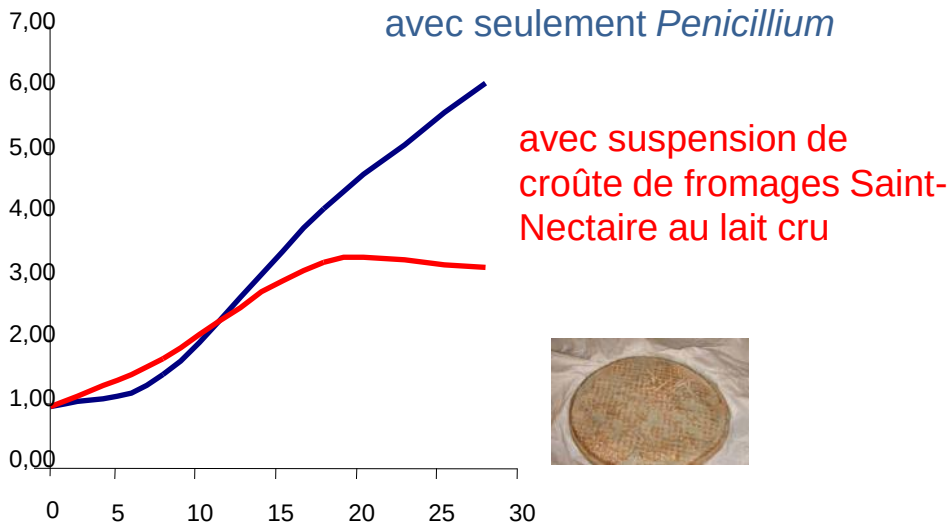
- Haut degré de sécurité microbiologique avec de faibles pourcentages de non conformités par rapport aux critères microbiologiques (règlement 2073-2005) (EFSA, 2012)
- Responsables de seulement 3,4% des toxi-infections alimentaires en Europe (EFSA, 2011, 2012).
 - Par exemple 2009 : données EFSA
 - Salmonella 19 cas <0,1% non conforme
 - STEC 18 cas Pas de norme (0-4,9% positifs, plus si uniquement recherche des gènes de virulence)
 - *Listeria monocytogenes* 2 cas
 - Fromages vache pâte molle lait pasteurisé 0-5.2%
 - Fromage vache pâte molle lait cru 0-1.1%
 - Fromage vache pâte dure lait pasteurisé 0, 4-1,9%
 - Fromage vache pâte dure lait cru 0,2-4%
 - Toxines produites par *Staphylococcus* : 88 cas (21% fromages au lait cru, 3,4% produits laitiers, 2,3% lait) Peu de données sur non conformité

Stratégie de biopreservation

- Gestion de la biodiversité microbienne en amont au niveau de la production de lait
 - Eliminer les bactéries pathogènes et préserver la biodiversité
 - ⇒ Connaissances des flux microbiens des environnements au lait



Inhibition de *L. monocytogenes* par des communautés microbiennes de croûte de Saint-Nectaire

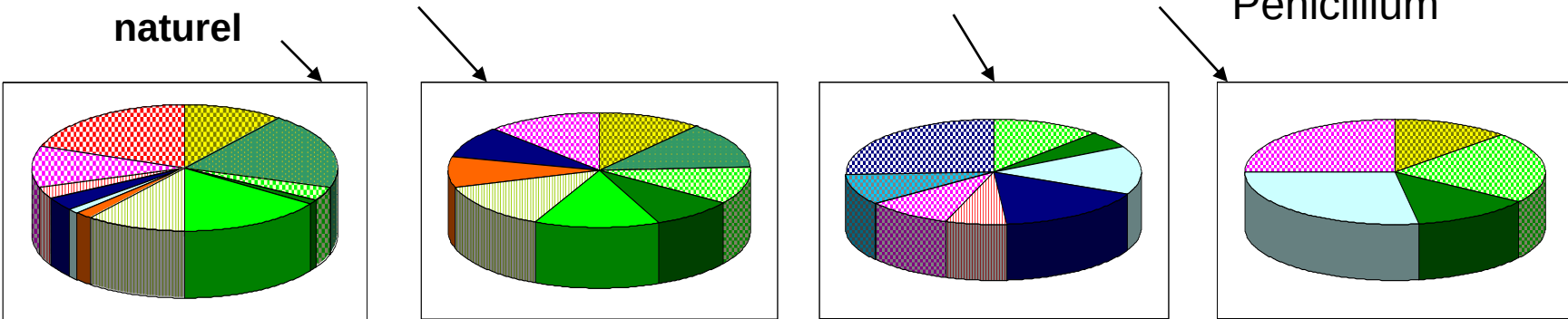
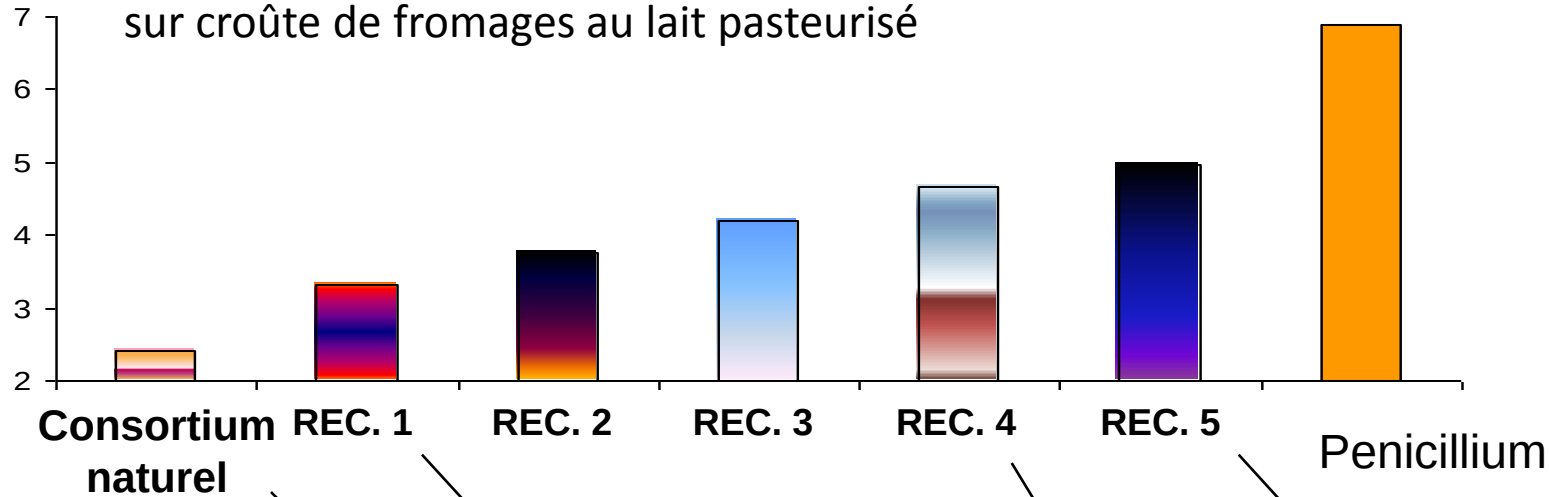


- ➔ Inhibition avec des communautés microbiennes complexes de surface de Saint-Nectaire
 - ➔ Dominance d'une grande diversité de bactéries lactiques non inhibitrices de *Listeria in vitro*
 - ➔ Présence d'espèces halophiles peu décrites dans le lait mais souvent détectées en surface de fromages à croûte lavée

Callon et al, 2012

Reconstitution de communautés

LogN Croissance (à 28 j) de *Listeria monocytogenes*
sur croûte de fromages au lait pasteurisé



➞ Inhibition quand dominance du groupe *Vagococcus-Carnobacterium-Enterococcus Marinilactobacillus psychrotolerans* au détriment des bactéries d'affinage

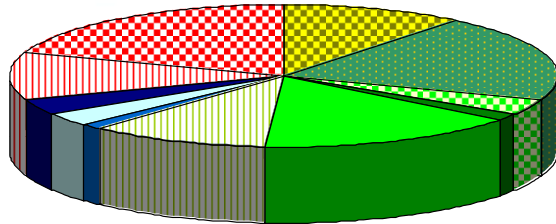
➞ Inhibition associée à la production d'acides organiques (acétate) et au catabolisme du citrate

Callon et al, 2012

Des communautés microbiennes de surface de fromages aux propriétés antilistéria



Saint-nectaire

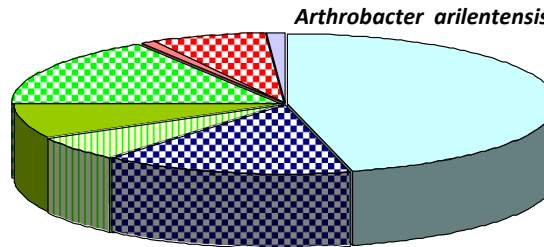


Dominance

Leuconostoc mesenteroides
Lactobacillus
Vagococcus-Carnobacterium-Enterococcus
Marinilactobacillus psychrotolerans

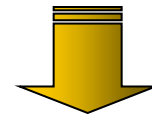


Munster

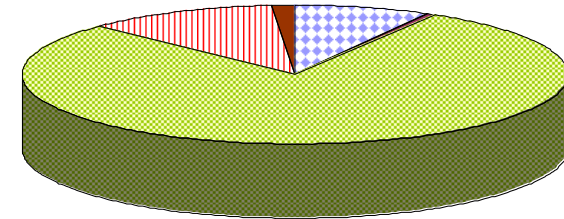


Dominance

Arthrobacter arilentensis
Staphylococcus equorum
Marinilactobacillus psychrotolerans



smear cheese



Dominance

Vagococcus-Carnobacterium-Enterococcus

Les propriétés anti-listéria de communautés microbiennes ne sont pas associées

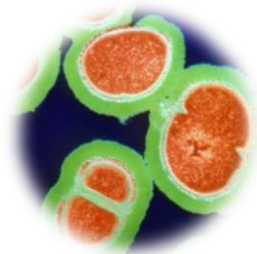
- au degré de diversité de la communauté
- aux propriétés anti-listéria des individus *in vitro*

Callon et al, 2012 ; Bleicher et al, 2010 ; Monnet et al, 2010



Lactococcus lactis influe sur l'état de la virulence de *Staphylococcus aureus*

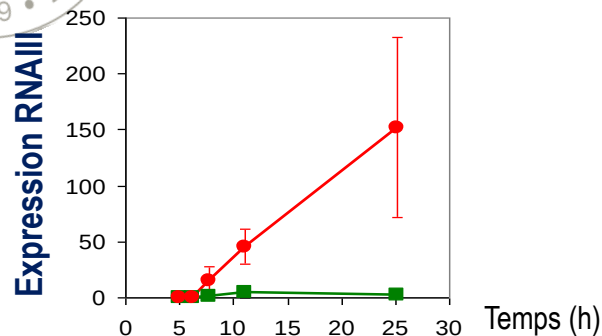
- La biopréservation peut influencer l'état physiologique (de virulence) des bactéries dans la matrice alimentaire et ainsi influencer sur l'effet après ingestion :
 - En culture liquide et MCD, comme en matrice fromagère, la virulence de *S. aureus* est atténuée par la présence de *L. lactis*
 - Des gènes régulateurs de la virulence sont affectés, ainsi que certains gènes d'entérotoxines, mais le gène de l'entérotoxine A n'est pas affecté



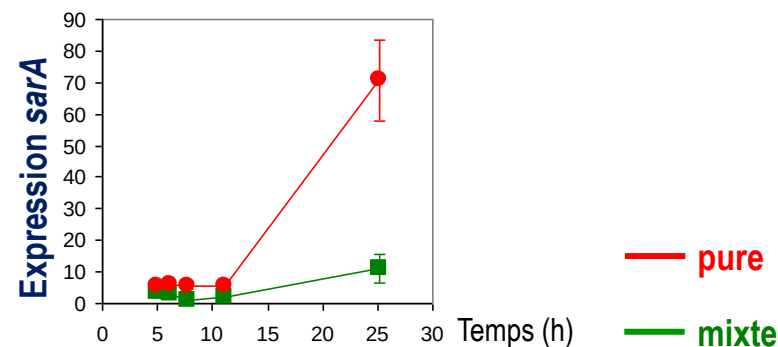
L. lactis inhibe l'expression des 2 principaux systèmes de régulation de la virulence chez *S. aureus*



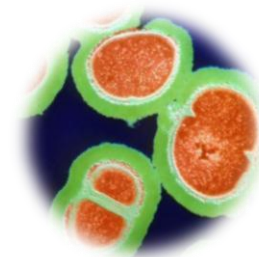
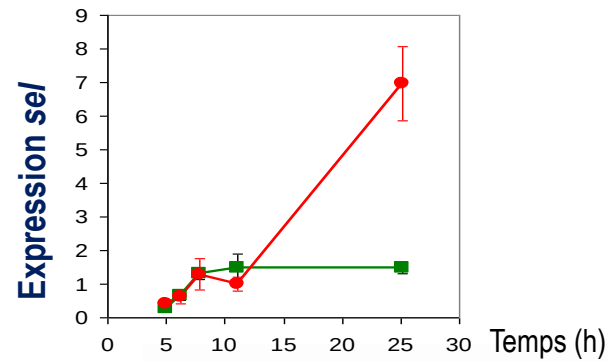
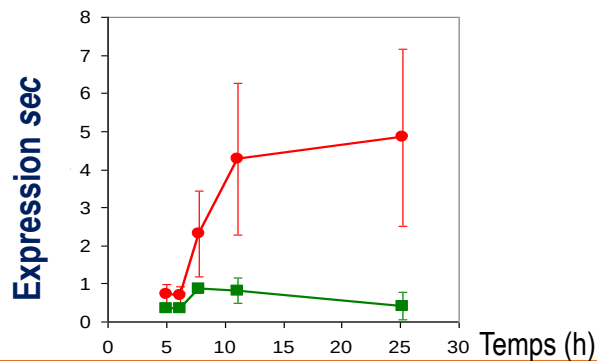
■ Système *agr*



■ Système *sar*



L. lactis module l'expression de certains gènes d'entérotoxines chez *S. aureus*



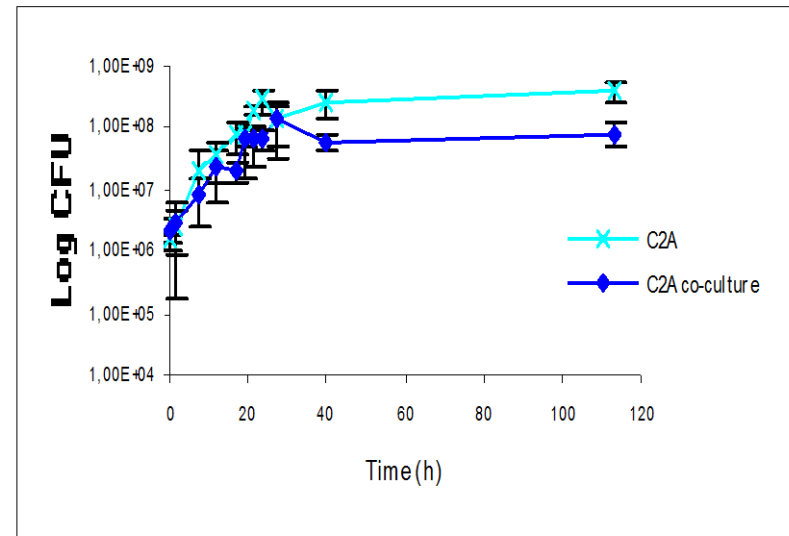
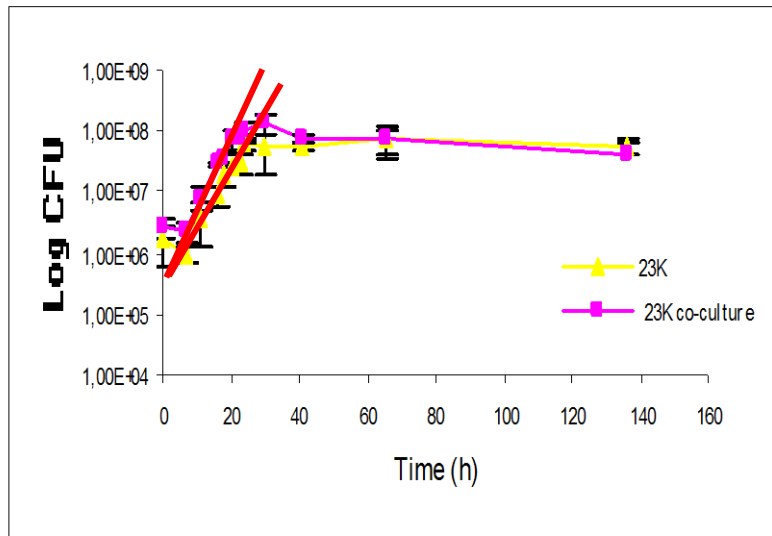
Interactions microbiennes au sein des produits carnés et
biopréservation



En matrice saucisson, *Staphylococcus xylosus* accélère la croissance de *Lactobacillus sakei*

La présence de *L. sakei* diminue légèrement la population finale de *S. xylosus*

Les deux espèces survivent bien



Projet ANR GÉNOFERMENT

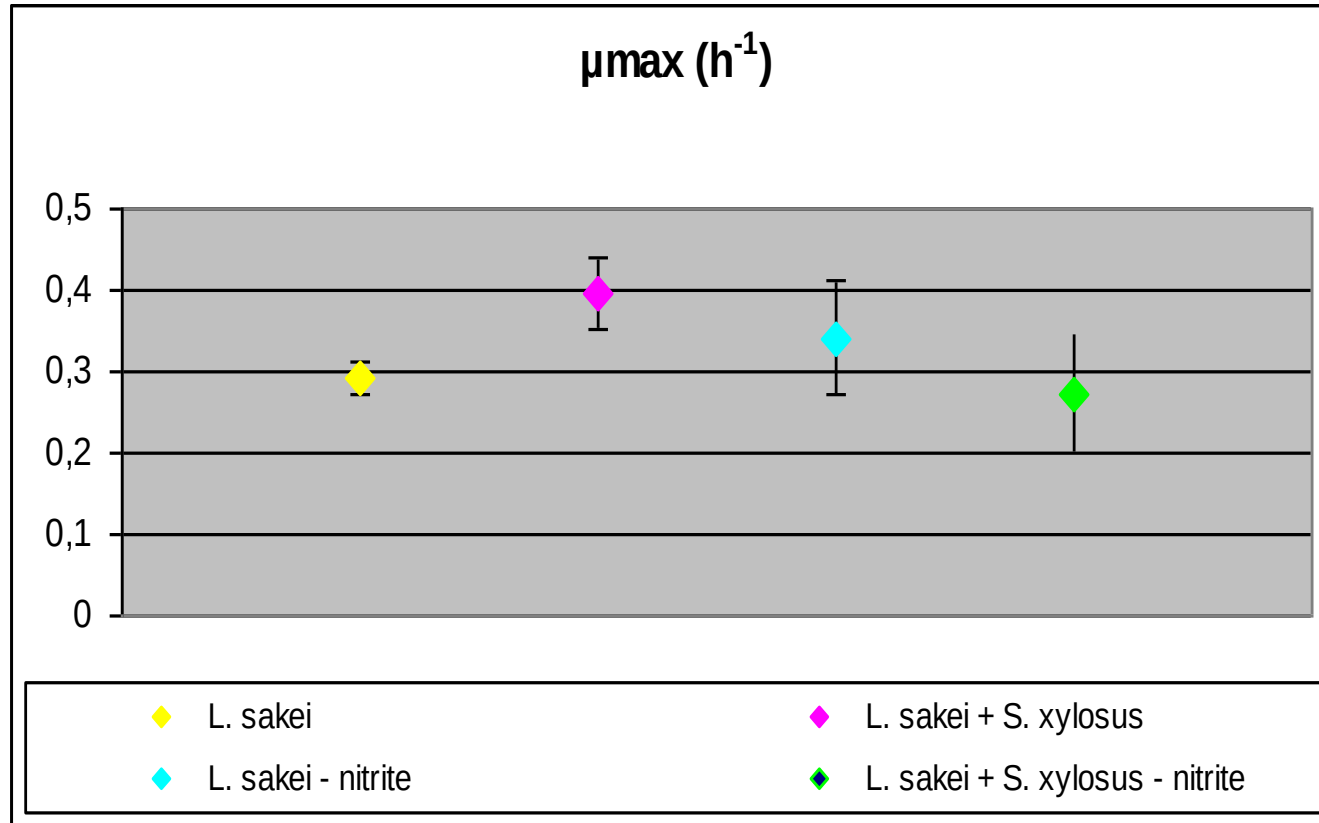
2005-2008



Financé par
ANR

CARREFOURS
DE L'INNOVATION AGRONOMIQUE

En matrice saucisson, l'effet positif de *S. xylosus* sur *L. sakei* disparaît lorsque le sel nitrité est omis



Projet ANR GÉNOFERMENT

2005-2008



Un cocktail de souches pour la biopréservation du carpaccio

Témoin T₀



Altération naturelle T₁₄



Cocktail SFP01 T₁₄



Projet ABA, 2008-2010

Projet MEM, 2012-2013

Conclusion



Conclusion

Les travaux menés au sein de l'INRA

Permettent des avancées utiles

à la connaissance des écosystèmes microbiens des aliments

à leur maîtrise

à l'amélioration des qualités (microbiologiques)

pour la biopréservation

Garantissent

la conservation de la biodiversité microbienne utile

et son exploration