



Ecosystèmes microbiens et préservation des aliments

Monique Zagorec, Marie-Christine Champomier-Verges, Pierre Renault,
Florence Valence, Yves Le Loir, Marie-Christine Montel

► To cite this version:

Monique Zagorec, Marie-Christine Champomier-Verges, Pierre Renault, Florence Valence, Yves Le Loir, et al.. Ecosystèmes microbiens et préservation des aliments. Innovations Agronomiques, 2012, 24, pp.57-77. 10.17180/ckm8-9w22 . hal-01019534

HAL Id: hal-01019534

<https://hal.science/hal-01019534>

Submitted on 29 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

Ecosystèmes microbiens et préservation des aliments

**M. Zagorec^{1,2}, M. Champomier-Vergès^{3,4}, P. Renault^{3,4},
F. Valence^{5,6}, Y. Le Loir^{5,6}, M.C. Montel⁷**

¹ INRA, UMR1014 Secalim, 44307 Nantes, ² LUNAM Université, Oniris, 44307 Nantes,

³ INRA, UMR1319 Micalis, 78350 Jouy-en-Josas, ⁴ AgroParisTech, UMR Micalis, 78350 Jouy-en-Josas,

⁵ INRA, UMR1253 STLO, 35042 Rennes, ⁶ Agrocampus Ouest UMR1253 STLO, 35042 Rennes,

⁷ INRA URF545, 15000 Aurillac.

Correspondance : monique.zagorec@oniris-nantes.fr

Résumé

Les aliments sont naturellement contaminés par une flore microbienne diverse provenant des matières premières et des différentes étapes de leur préparation. De plus, les produits fermentés sontensemencés par des ferments participant au processus de fermentation. Ils constituent donc des écosystèmes alimentaires où les différentes espèces en présence vont entrer en compétition et se développer à différents niveaux jusqu'à la fin de la conservation. Préserver les aliments consiste à en garantir la bonne qualité, notamment microbiologique, et donc à maîtriser ces écosystèmes. Une pratique ancestrale et longtemps empirique comme la fermentation est un exemple de préservation de l'aliment (viande, lait, végétaux) résultant des activités des bactéries, levures ou moisissures, qui assurent la qualité sanitaire et organoleptique de ces produits. Les écosystèmes des aliments sont de plus en plus étudiés, grâce notamment à la métagénomique, et de nouvelles pistes apparaissent pour assurer la conservation des aliments, qu'ils soient fermentés ou non, grâce à des espèces microbiennes. Il s'agit de la biopréservation par laquelle l'ajout de cultures protectrices va permettre de lutter contre un développement excessif de flores indésirables et ainsi contribuer à améliorer les qualités sanitaires et organoleptiques des aliments.

Mots-clés : Cultures protectrices, écosystèmes alimentaires, produits fermentés, métagénomique, Centre de Ressources Biologiques (CRB)

Abstract : Microbial ecosystems and food preservation

Food stuffs are naturally contaminated by a diverse microbial flora issued from food components and from the various processing steps. In addition, fermented foods are also inoculated with starters participating to the fermentation process. Therefore, foods constitute ecosystems hosting various species which will have to compete and will develop to various extents until the end of the storage period. Preserving food means to guaranty its quality, especially microbial safety, and consequently to master these ecosystems. An ancestral and mostly empirical long term use such as fermentation exemplifies food (meat, milk, vegetables) preservation, resulting from bacterial, yeasts and moulds activities which ensure sensorial and microbiological quality of fermented foods. Food microbial ecosystems are now more and more investigated, notably because of metagenomics development, and new fields are opening, aiming at preservation of both fermented and non-fermented products by the

use of microorganisms. The so-called biopreservation, through inoculation of protective cultures, will allow fighting an excessive development of unwanted flora and thus will contribute to improve both sensorial and microbial qualities of food.

Keywords: Protective cultures, food ecosystems, fermented food, metagenomics, Biological Ressources Center (BRC)

1. Introduction

1.1. *Ecosystèmes alimentaires et biopréservation*

Les aliments sont des denrées extrêmement périssables. En effet, ils sont porteurs de nombreuses espèces bactériennes, de levures ou de moisissures qui en se développant au cours de la conservation et du stockage peuvent les altérer. De plus la présence de certaines espèces, pathogènes pour l'Homme, peut être responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Il existe cependant une microflore naturellement présente sur les aliments, qui peut entrer en compétition avec ces flores indésirables et ainsi contribuer à garantir la qualité sanitaire et sensorielle. C'est ainsi que les 30 dernières années ont conduit à l'émergence du concept de la technologie de barrière (Leistner, 2000 pour revue) qui consiste à appliquer un ensemble de procédés, contribuant chacun à inhiber le développement des flores indésirables. L'importance de la flore résidente dans cet effet barrière a été pointé et a conduit à la proposition du terme Anglais de « biopreservation » défini par Stiles en 1996 en ces termes : « Biopreservation refers to extended storage life and enhanced safety of foods using the natural microflora and (or) their antibacterial products ». La sélection de souches efficaces parmi la flore résidente, pour les rajouter aux aliments est ainsi envisagée. Les termes de flores ou de cultures protectrices ou bioprotectrices et de bioprotection en ont découlé.

1.2. *La fermentation, une biopréservation ancestrale ?*

La fermentation, naturelle et empirique, de nombreux substrats (viande, poisson, lait, jus de fruits, choux, etc.) pour les transformer en aliments élaborés et stables (saucissons et poissons fermentés, fromages, vin, bière, choucroute, etc.) est ainsi attestée depuis des millénaires. Mais ce n'est qu'au cours des 19^e et 20^e siècles que le rôle des flores microbiennes dans le processus de fermentation a été décrit. Outre l'incidence sur les qualités organoleptiques que l'intervention de ces flores procure aux produits fermentés, les conséquences de la fermentation sur la qualité sanitaire des produits est maintenant bien comprise. C'est ainsi que des pratiques ancestrales de réensemencement à partir de produits fermentés pour en produire de nouveaux ont d'abord été utilisées puis ont évolué vers la sélection et l'ensemencement par des souches sélectionnées : il s'agit des ferments qui ne sont devenus d'usage courant qu'au cours de la fin du 20^e siècle. Cette pratique, initialement utilisée pour les produits laitiers fermentés s'est ensuite étendue aux autres aliments fermentés. Les ferments ensemencés contribuent à assurer la qualité sensorielle des produits et aussi la qualité microbiologique par un ensemble de mécanismes incluant la production d'acides organiques et d'autres molécules antibactériennes, ou encore la compétition pour les substrats nutritifs. La fermentation peut alors être considérée comme une forme de biopréservation. Cependant, l'élargissement de l'utilisation de flores protectrices à des produits non fermentés est également envisagé, de nombreuses études ayant montré un effet avéré de l'ajout de certaines souches sur la réduction de flores pathogènes ou d'altération. Pour un tel usage dans les produits non fermentés, l'effet recherché des flores protectrices est d'assurer la qualité microbiologique de l'aliment, sans en modifier les qualités sensorielles. Doit-on alors les considérer comme des ferments, des ingrédients, des additifs ?

Pour l'instant, la question n'est pas tranchée.

1.3. Les écosystèmes alimentaires des produits fermentés et non fermentés

Le répertoire microbiologique des aliments a longtemps été étudié grâce à des méthodes de culture sur milieux bactériologiques. Des méthodes moléculaires et non culturales se sont récemment développées, qui permettent de réviser nos connaissances et d'approfondir la définition des écosystèmes alimentaires. Ces approches de métagénomique par séquençage à haut débit et directement à partir de l'ADN bactérien extrait de matrices alimentaires ont initialement été utilisées sur des produits fermentés, comprenant une flore microbienne élevée mais de diversité relativement pauvre (Humblot et Guyot, 2009 ; Sakamoto *et al.*, 2011 ; Kiyohara *et al.*, 2012 ; Park *et al.*, 2012 ; Roh *et al.*, 2012 ; van Hijum *et al.*, in press). Les études d'aliments non fermentés, présentant une plus grande diversité d'espèces, n'en sont qu'à leur tout début (Nieminen *et al.*, 2012 ; ECOBIOPRO, 2011). Les premières analyses visaient principalement à établir un catalogue des espèces présentes grâce au séquençage de l'ADN ribosomique 16S (ADNr), et des études plus récentes visent à déterminer l'ensemble des génomes présents afin de lister les fonctions bactériennes potentiellement présentes. L'étape suivante sera la caractérisation des fonctions réellement exprimées (séquençage des ADNc à partir des ARN totaux, ou métatranscriptomique).

La connaissance de la composition des écosystèmes des aliments est donc maintenant de plus en plus accessible et l'étude globale des interactions des microbes qui y résident est rendue possible. Comprendre la fermentation mais aussi les mécanismes mis en jeu lors de la biopréservation devrait donc être une future étape pour les microbiologistes de l'alimentation.

1.4. Les prérequis pour une biopréservation efficace

Pour pouvoir mettre en œuvre des flores protectrices efficaces et à des fins bien déterminées, un ensemble de connaissances et d'outils sont nécessaires. Ceci inclut : i) une description la plus exhaustive possible de l'écosystème alimentaire et des espèces indésirables à cibler ; ii) un réservoir de souches, très diverses, bien caractérisées et pouvant être criblées pour différentes utilisations, dont la bioprotection ; iii) une bonne connaissance des interactions microbiennes au sein de l'écosystème et des mécanismes mis en œuvre par les flores protectrices. Ces différents aspects, abordés dans différents laboratoires de l'INRA seront développés ci-dessous.

2. Métagénomique des aliments

2.1. Métagénomique : quelques définitions et aperçu des méthodes

Les microbiologistes utilisaient classiquement le microscope et les boîtes de Pétri pour étudier les microorganismes. Il arrive parfois que des milieux où ceux-ci peuvent être détectés en abondance ne permettent pas d'obtenir des colonies en nombre attendu, révélant ainsi une « grande anomalie de comptage », qui reflète en fait la non-cultivabilité de certaines espèces microbiennes (Staley et Konopka, 1985). Pour mieux étudier la composition de ces flores non cultivables, il est apparu que l'étude de leur ADN, après extraction directe, permettait d'accéder à un certain niveau d'information, sur les espèces concernées, ou sur certaines fonctions qu'elles pouvaient exercer. Différentes techniques ont été mises au point et ont évolué en fonction des avancées technologiques, comme le clonage de molécules directement après extraction d'ADN ou l'amplification de marqueurs taxonomiques. Puis, avec l'apparition de techniques de séquençage à haut ou très haut débit, le séquençage direct des

molécules a permis un développement rapide de ces techniques dites de métagénomique (Temperton et Giovani, 2012).

De fait, les débuts de la métagénomique ressemblaient largement à l'application des techniques de biologie moléculaire pour étudier à relativement faible échelle des molécules à valeur taxonomique, comme les copies d'ADNr, ou des fonctions dûment criblées après clonage dans *Escherichia coli*. Leur développement a été largement motivé par la non-cultivabilité de larges parties des populations microbiennes de certains environnements comme la mer, le sol, les bioréacteurs en remédiation ou les écosystèmes digestifs. Ces techniques peuvent aussi être appliquées à d'autres écosystèmes où la cultivabilité n'est pas un obstacle majeur aux études, mais où, les techniques de microbiologie deviennent trop laborieuses pour étudier des populations minoritaires, en particulier si aucun milieu ne permet de les distinguer des populations majoritaires. Ce cas est classique dans la plupart des écosystèmes, dont les écosystèmes fermentaires alimentaires traditionnels ou naturels, où coexistent à différentes proportions des populations proches taxonomiquement et à différents niveaux.

2.2. Métagénomique monogénique (pyroséquençage d'ADNr) exemples et données

Dans les écosystèmes fermentaires, la plupart des études métagénomiques ont été réalisées pour mesurer la biodiversité et définir les différentes espèces présentes. Les techniques les plus utilisées sont basées sur l'étude des variations présentes dans les séquences des ADNr. Au-delà de la caractérisation de la composition taxonomique par l'étude des ADNr, des études focalisées sur des fonctions peuvent permettre de mettre en lumière des aspects fonctionnels au travers des études métagénomiques (Suenaga, 2012).

Le principe de l'utilisation de séquences « à valeur taxonomique » est simple. Les séquences d'ADNr sont supposées descendre d'une copie ancestrale commune ayant accumulé des mutations lors de la différenciation des espèces, et en les comparant, il est possible de les regrouper selon leur ressemblance. Les distances obtenues sont supposées refléter la taxonomie des espèces dont elles proviennent (Janda et Abbott, 2007). Elles donnent des résultats satisfaisants pour de nombreuses études et ont généré la base des connaissances actuelles sur de nombreux écosystèmes (Petrosino et al., 2009). Des chaînes d'analyse informatique appropriées sont disponibles (Caporaso et al., 2010).

Si ce principe est encore communément utilisé, la méthode d'obtention des séquences a été récemment révolutionnée par quelques innovations technologiques. Globalement, la chaîne d'analyse débute par une amplification avec des oligonucléotides plus ou moins « universels » ciblant la séquence d'intérêt, ce qui permet de focaliser les efforts de séquençage sur une fraction utile des ADN. Les premières analyses ont été réalisées sur quelques dizaines de molécules, clonées avant séquençage ; elles le sont maintenant sur des centaines de milliers de séquences d'un même échantillon, permettant ainsi de réaliser des analyses couvrant des populations minoritaires. Enfin, la dernière révolution est venue de la possibilité de séquencer en parallèle des centaines d'échantillons grâce à un système de code-barres, réduisant ainsi le coût des échantillons et ouvrant les portes à des analyses métagénomiques comparatives à grande échelle (Hamady et al., 2008). Ces méthodes ont été appliquées à divers écosystèmes alimentaires tels que le lait et ses dérivés (Masoud et al., 2012 ; Quigley et al., 2012), les végétaux (Humbot et Guyot, 2009 ; Jung et al., 2011 ; Illegghems et al., 2012), et les produits de la mer (Rohet et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces analyses ont permis de confirmer la présence de nombreux microorganismes dans ces produits, voire d'en découvrir de nouveaux.

2.3. Métagénomique (séquençage entier d'écosystèmes) exemples et données

L'augmentation de la capacité des séquenceurs de nouvelle technologie a stimulé le développement d'études basées sur l'analyse de l'ensemble des séquences d'ADN extraites des écosystèmes, sans amplification de marqueur particulier. En principe, dans ces études, les analyses donnent accès aux gènes, et donc aux fonctions portées par l'écosystème. Actuellement, deux types de données peuvent être fournies par les séquenceurs très haut débit : des séquences de taille moyenne (~400 à 700 pb) et à haut débit (un million), et des séquences courtes (50 à 150 pb) à très haut débit (1-6 milliard). Dans les deux cas, l'analyse directe de tels jeux de séquences a posé un réel défi. Différentes chaînes d'analyse commencent maintenant à être disponibles, qui diffèrent selon que les séquences sont de type moyenne ou courte.

Les analyses des séquences moyennes peuvent être réalisées par des méthodes classiques (traduction en protéines, puis recherches d'homologies) pour assigner ces séquences à des groupes de gènes similaires, ce qui peut donner accès à des fonctions potentielles. Des chaînes d'analyse bioinformatique sont disponibles pour ces études (Meyer *et al.*, 2008; Arumugam *et al.*, 2010) et il est possible de visualiser les voies métaboliques à partir des gènes annotés (Yamada *et al.*, 2009). Pour les séquences courtes, le traitement se fait par cartographie sur des séquences de référence, en général déjà annotées. Le nombre de lectures touchant les différents gènes donne un comptage relatif des molécules présentes dans l'échantillon. Le talon d'Achille de cette technique est la nécessité d'avoir à disposition une base de données de référence, en général très incomplète pour les écosystèmes complexes. Pour des écosystèmes plus simples comme les aliments fermentés, constitués de quelques centaines d'espèces au maximum, la constitution de catalogues de référence devient à la portée de projets de recherche de taille raisonnable. Il est aussi possible de constituer des références en assemblant directement les lectures. Dans ce cas, les gènes correspondant aux espèces suffisamment abondantes et dont la couverture est suffisamment redondante peuvent être assemblés, et constituer la base d'un catalogue de gènes de référence (Qin *et al.*, 2010). L'assemblage peut aussi être appliqué en transcriptomique où c'est l'ADNc constitué à partir des ARN qui est séquencé (Grabherr *et al.*, 2011). Enfin, il est parfois possible, avec un nombre suffisant d'échantillons, de proposer un groupement de ces gènes en génomes (Qin *et al.*, 2010; Nielsenn *et al.*, en préparation).

Cette technologie a été appliquée à une quarantaine de fromages traditionnels dans le cadre du programme ANR Food-Microbiome. Les cartographies ont d'abord été réalisées avec les génomes disponibles dans les bases de données publiques, puis les séquences génomiques de 15 levures et champignons filamenteux et de 150 bactéries fromagères ont été déterminées pour compléter la base de données de référence (Ameida *et al.*, en préparation), augmentant ainsi le taux de cartographie de la plupart des échantillons (Pons *et al.*, en préparation). Dans ces conditions et avec des traitements bioinformatiques appropriés, il est possible de détecter les espèces présentes avec une dynamique de 10^4 - 10^5 , les gènes des espèces présentes à au moins 1/1000 de la population totale, et de caractériser le polymorphisme nucléotidique des espèces présentes à plus de 5% de la population (Abraham *et al.*, en préparation). Ainsi, cette étude a montré la prévalence de bactéries halophiles et psychrotrophes dans de nombreux fromages, et la prolifération de flores non lactiques au niveau des surfaces des fromages. Enfin, des caractéristiques particulières (protéases, lipases, éléments mobiles...) de souches fromagères peuvent être tracées par la détection de gènes qui leur sont spécifiques. Bien qu'encore préliminaire, il est attendu que ce type de résultat permette de reconstituer les potentialités métaboliques d'écosystèmes alimentaires, et par la suite de mieux comprendre leur développement, leur capacité de résilience et leurs interactions. Enfin, ces méthodes peuvent aussi s'appliquer aux ARN extraits des écosystèmes (Gilbert et Hughes, 2011). Quelques études ont été ainsi réalisées sur des fermentations végétales (Nam *et al.*, 2009 ; Weckx *et al.*, 2011) ou sont en cours sur des écosystèmes fromagers reconstitués (Bonname, projet ANR ExEco, 2010-2013), mettant ainsi en évidence les communautés les plus actives, ou leurs interactions avec les bactériophages.

3. Conservation de la biodiversité microbienne des aliments : rôle des Centres de Ressources Biologiques (CRB)

3.1. Le CIRM, un CRB de l'INRA dédié à la préservation et à l'exploration de la biodiversité microbienne

La biodiversité se décline selon trois niveaux : la diversité des espèces, la diversité des gènes au sein de chaque espèce, la répartition et l'organisation des écosystèmes. Concernant les microorganismes et plus particulièrement les bactéries, on estime que seulement 1% du nombre d'espèces est connu à ce jour (moins de 10% pour les levures et champignons). Ainsi, en 1980, seules 2500 espèces bactériennes étaient identifiées contre 7300 aujourd'hui pour un nombre total potentiel de plus de 400 000 espèces (Giri *et al.*, 1992, www.unep-wcmc.org). La biodiversité représente un intérêt écologique et technologique indéniable et possède de ce fait une valeur économique intrinsèque. En effet, le développement de nouveaux produits ainsi que l'apparition de nouveaux marchés par les biotechnologies ou *via* les industries agroalimentaires génèrent des secteurs d'activités et de profits. Cela nécessite de ce fait une gestion appropriée des ressources. Afin de préserver cette biodiversité, de favoriser son utilisation à des fins de développement durable ainsi que pour un partage équitable des profits générés par les ressources biologiques, une Convention pour la Biodiversité a été ratifiée par 168 pays, dont la France, à Rio en 1992 (www.cbd.int). L'objectif pour chaque état membre étant de développer des stratégies nationales pour la conservation et la valorisation de la diversité biologique. Le concept de Centre de Ressources Biologiques (CRB) a été défini pour la première fois en 1999 lors du protocole de Tokyo comme étant « le support des sciences de la vie et des biotechnologies ». L'Organisation du Commerce et du Développement Economique (OCDE, www.oecd.org) a fourni une liste de prescriptions relatives au bon fonctionnement des CRB. Ce sont des centres de ressources spécialisés qui acquièrent, valident, étudient et distribuent les ressources. Ils doivent avoir un standard de qualité élevé, être détenteurs d'une expertise par rapport au type de ressources hébergées et mener une activité de recherche intrinsèque sur ces ressources.

C'est dans ce contexte qu'en 2004 l'INRA a décidé de créer un CRB dédié à la préservation et à l'exploration de la biodiversité microbienne appelé Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM). L'objectif était de mieux organiser et valoriser le patrimoine génétique inestimable représenté par l'ensemble des collections INRA en l'ouvrant aux communautés scientifiques et industrielles ainsi qu'aux filières concernées. Le CIRM est un groupement d'intérêt scientifique constitué à ce jour de cinq CRB microbiens thématiques fonctionnant en réseau. Il regroupe ainsi des collections de champignons filamenteux (CIRM-CF, INRA Marseille), de bactéries associées aux plantes (CIRM-CFBP, INRA Angers), pathogènes de la chaîne alimentaire (CIRM-BP, INRA Tours), ou d'intérêt alimentaire (CIRM-BIA, INRA Rennes), et de levures d'intérêt technologique (CIRM-Levures, INRA Grignon). Convaincu qu'une recherche de haut niveau ne peut se faire que sur un matériel biologique de grande qualité, avec une traçabilité irréprochable et l'assurance de disposer des données minimales associées aux souches, l'ensemble des cinq CIRM est certifié selon la norme ISO 9001:2008.

Concernant les microorganismes d'intérêt alimentaire, les objectifs du CIRM sont concrètement :

- i) de préserver à long terme et d'explorer en haut débit la biodiversité des microorganismes d'intérêt alimentaire pour être à même de fournir, aujourd'hui et demain, des souches optimales au regard de la qualité et de la sécurité des aliments ;
- ii) de contribuer à la compréhension des mécanismes à l'origine de la biodiversité ;
- iii) d'enrichir l'offre des souches disponibles ;
- iv) d'offrir un lieu et des modalités de conservation de collections bactériennes, publiques ou privées.

3.2. De l'intérêt de préserver les microorganismes d'intérêt alimentaire au sein de structures dédiées

Les microorganismes d'intérêt alimentaire sont clés pour la fabrication des aliments fermentés et biopréservés. Par la nature, la quantité et la complémentarité de leurs enzymes, ils ont un impact majeur sur la qualité des produits finis et confèrent aux produits fermentés une grande part de leur typicité et de leurs caractéristiques. Ils constituent donc un patrimoine et sont une source d'innovation potentielle dont il faut préserver la biodiversité. En effet, si l'on se réfère aux produits laitiers fermentés, l'évolution des pratiques a fortement contribué à faire diminuer les niveaux microbiens des laits (Bouton *et al.*, 2005 ; Mallet *et al.*, 2012).

Les microorganismes jouent des rôles très divers : acidification, influence sur la texture, la couleur, les qualités organoleptiques, propriétés thermo-fonctionnelles, propriétés d'inhibition des flores pathogènes et d'altération, propriétés nutritionnelles,.... Ainsi leur utilisation en tant que levain fonctionnel, permet de cibler des propriétés d'intérêt (Ravyts *et al.*, 2012). Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés antifongiques (Brosnan *et al.*, 2012), limitant ainsi le recours aux additifs alimentaires. Dans certains produits laitiers fermentés l'addition de bactéries non levain (NSLAB) augmente le niveau d'acides aminés, de peptides, et d'acides gras libres augmentant les qualités organoleptiques accélérant l'affinage (Cagno *et al.*, 2012). Certaines bactéries lactiques jouent un rôle clé dans la réduction de substances toxiques ou antinutritives dans des produits végétaux fermentés tels que le manioc ou le soja jaune (Westby *et al.*, 1997 ; Kostinec *et al.*, 2007). Ces différentes propriétés conduisent à un élargissement des applications potentielles des microorganismes voire à une « flexibilité » accrue de la composition des levains.

L'ensemble de ces propriétés est extrêmement souche-dépendant. Pour exemple, Chaillou *et al.* (2009) ont caractérisé la diversité intra-spécifique de l'espèce *Lactobacillus sakei*, naturellement présente dans les produits de la mer et carnés. Ils ont montré la capacité de ces microorganismes à s'adapter aux procédés technologiques qui induit de la variabilité clonale au sein de cette espèce. Dans le cas de *Propionibacterium freudenreichii*, utilisé dans la fabrication de l'Emmental, on peut observer une grande variation dans la capacité des souches à survivre à un stress acide et biliaire, susceptible d'être rencontré après ingestion, ou à métaboliser l'aspartate (Lan *et al.*, 2007 ; Turgay *et al.*, 2011).

Les CRB, offrent dans ce contexte, un cadre de préservation et de valorisation adapté, tant pour les partenaires académiques qu'industriels, qui peuvent y trouver des souches aux propriétés connues et originales. Par leurs activités de préservation et de collecte ciblée, ils sont en mesure d'offrir, pour une espèce donnée, une large diversité de souches en termes d'origine géographique, de biotope et d'année d'isolement. Ce dernier point pose le problème du choix des souches à collecter et à conserver, afin d'être sûr de couvrir une diversité représentative de l'espèce, mais aussi la difficulté à prédire aujourd'hui les souches dont nous aurons besoin demain. Ces choix doivent faire l'objet de réflexions concertées avec les utilisateurs. Les CRB doivent également assurer un accès légitime aux ressources dans un cadre juridique défini et consensuel. Ainsi, afin de respecter la Convention de la Biodiversité, pour les souches provenant d'un pays étranger, seules celles isolées avant 1993 sont dites libres de droit et peuvent potentiellement faire l'objet de valorisation. De même toute diffusion de souche doit faire l'objet d'un « Material Transfert Agreement » (MTA) qui permet de définir la propriété des souches et est garant du bon usage qui en est fait. En cas de valorisation, il garantit un retour équitable vers le propriétaire de la souche. Dans la mesure où les CRB ont une politique de diffusion large et ouverte, pour une mise à disposition de la biodiversité au service des partenaires académiques et industriels, il est primordial de respecter ce cadre légal compte tenu du fort potentiel d'innovations biotechnologiques associé à ces microorganismes d'intérêt alimentaire, en particulier à des fins de biopréservation.

4. Fermentation et biopréservation des produits laitiers

4.1. Fermentation et salubrité des produits laitiers

Les produits laitiers laits fermentés, yaourts, beurres, crèmes et autres desserts lactés, fromages frais ou affinés, sont très divers mais partagent le même ingrédient de base : le lait, matière première vivante instable, issue essentiellement de vache, de brebis ou de chèvre. Ils découlent d'une multitude de traitements technologiques du lait (traitement thermique comme la pasteurisation ou traitement à ultra haute température ou physique comme la microfiltration) et de procédés fermentaires plus ou moins complexes. Ils peuvent être consommés sans autre préparation. La diversité et la complexité des fermentations sont inhérentes i) à la diversité des caractéristiques biochimiques des laits en lien avec la race animale, l'alimentation, à la diversité des traitements du lait (cru, thermisé et pasteurisé) ; ii) à la diversité des populations microbiennes responsables de la fermentation (de l'ensemencement exogène mono souche ou levain, à une fermentation par des populations microbiennes endogènes très diverses) ; iii) à la diversité des paramètres technologiques de fabrication et d'affinage. Par essence, les produits laitiers fermentés satisfaisant le plaisir gustatif des consommateurs et répondant aux exigences sanitaires réglementaires du « paquet hygiène » (n°852/2004, 2073/2005) sont des produits biopréservés. La France, 2^e producteur de lait en Europe, produit annuellement 2,2 millions de yaourts, 650 000 de tonnes de fromages frais et 1,1million de tonnes de fromages affinés dont 180 000 tonnes de fromage au lait cru (données du Cniel). Malgré cette production importante, les produits laitiers sont un des aliments les plus sûrs. Les fromages ne représentent que 3,4% de l'ensemble des TIAC (EFSA, 2011, 2012).

Le tableau 1 recense les TIAC en Europe en 2009 dues à *Salmonella*, *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC), *Listeria* ou *Staphylococcus*. Ces statistiques concordent avec la faible contamination des produits laitiers par ces bactéries pathogènes.

Pathogènes	Produits laitiers	Nombre de cas ¹	Fréquence de non-conformité ²
<i>Salmonella</i>	Tous types	19	<0,1%
STEC	Tous types	18	Pas de norme(0 à 4,9% positif)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fromages vache pâte molle lait pasteurisé Fromage vache pâte molle lait cru Fromage vache pâte dure lait pasteurisé Fromage vache pâte dure lait cru	2*	0-5.2% 0-1.1% 0, 4-1 9% 0,2-4%
Toxines produites par <i>Staphylococcus</i>	Fromages au lait cru, lait, autres produits laitiers	88 cas (21% fromages au lait cru, 3,4% produits laitiers, 2,3% lait)	Peu de données

Tableau 1 : Recensement des TIAC et exemples de non-conformité pour les produits laitiers.

¹Données EFSA 2011, ²données EFSA (période 2004-2009),* épidémie consommation fromages « quargel » (Fretzel *al.*, 2010).

La sécurité des produits laitiers doit s'analyser d'une part au regard des démarches de type HACCP mises en œuvre pour assurer l'absence de contaminants pathogènes dès la production de lait et à toutes les étapes des procédés technologiques et d'autre part par la stratégie de biopréservation adoptée. Si le microbiote contribue indéniablement à la qualité des produits, il est impossible d'éviter

complètement la contamination par des flores indésirables (équipement des caves d'affinage, des hommes) ainsi, malgré les efforts, les contaminations accidentelles sont toujours possibles. La maîtrise des flores d'altération est raisonnée au sein de chaque variété de produits laitiers et par rapport à son référentiel microbien et en termes de niveaux, en particulier dans les fromages de composition microbienne complexe. Si la présence des levures et moisissures est toujours indésirable dans les fromages frais, elle devient souvent indispensable dans les fromages.

4.2. Biopréservation des produits laitiers fermentés

4.2.1. Biopréservation des fromages de composition microbienne complexe

Des données scientifiques arguent pour un rôle autoprotecteur de certaines communautés microbiennes complexes des fromages ou de matériaux traditionnels (cuve en bois en fabrication ou planches d'affinage) vis-à-vis du développement de *L. monocytogenes* tout au long de l'affinage des fromages. En effet, plusieurs communautés microbiennes multi espèces aux activités anti-Listéria ont été identifiées à la surface de fromages à croûte lavée (Eppert *et al.*, 1997 ; Maoz *et al.*, 2003 ; Bleicher *et al.*, 2010a ; Imran *et al.*, 2010 ; Roth *et al.*, 2010), à la surface ou à cœur de fromages Saint-Nectaire (Retureau *et al.*, 2010 ; Millet *et al.*, 2006 ; Saubusse *et al.*, 2007), sur des cuves en bois (Didienne *et al.*, 2012) et des planches d'affinage (Mariani *et al.*, 2011). De toutes ces études, il ressort que ces communautés microbiennes inhibitrices diffèrent totalement en termes de composition en espèces, de niveau de diversité, de structure. Ainsi, une communauté microbienne de surface de fromages à croûte lavée inhibitrice est uniquement composée de bactéries à Gram positif non lactiques (*Corynebacterium*, *Brevibacterium* ...) (Maoz *et al.*, 2003). Par contre des bactéries lactiques aussi isolées de milieux marins (*Vagococcus*, *Facklamia*, *Alkalibacterium*, *Marinilactibacillus*) peuvent être impliquées dans l'inhibition à la surface de fromages à croûte lavée (Bleicher *et al.*, 2010a, b ; Roth *et al.*, 2010, 2011). L'ajout ou l'omission d'espèces microbiennes dans une communauté inhibitrice peut augmenter ou diminuer l'inhibition observée mais les communautés microbiennes inhibitrices reconstituées ont toujours une composition complexe (Imran *et al.*, 2010 ; Callon *et al.*, 2011a). En fait, sur une gélose au fromage cinq souches individuelles appartenant à des espèces de levure et de bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont une inhibition similaire à celle du consortium complexe (Imran *et al.*, 2010). Au cœur d'un fromage à pâte pressée non cuite l'association de 7 espèces de bactéries lactiques et 7 de bactéries non lactiques (Callon *et al.*, 2011a) inhibent *L. monocytogenes*. Par multiplications successives à la surface des fromages, Monnet *et al.* (2010) ont sélectionné un consortium composé de *Yarrowialipolytica*-*Vagococcus*-*Carnobacterium* et *Enterococcus* avec de fortes activités anti-Listéria. Les interactions microbiennes régissant ces inhibitions sont encore inconnues. La production de substances antagonistes, lactate, acétate (Callon *et al.*, 2011a), de bactériocines, de molécules non protéiques stables à la chaleur (Bleicher *et al.*, 2010b), et une compétition nutritionnelle ont été associées à l'inhibition, mais aucun effet de causalité n'a été démontré. L'analyse du transcriptome de *Listeria* révèle son état de stress lorsqu'elle est en contact avec des consortia anti-Listéria (Hain *et al.*, 2007), par l'induction de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, dans la réponse au stress et dans la synthèse de la paroi cellulaire. Ces études concluent également que, individuellement, les souches de ces communautésensemencées en surface de fromages ou dans le lait ne sont pas inhibitrices. Elles illustrent ainsi la difficulté de sélectionner des souches biopréservatrices de ces produits efficaces contre *L. monocytogenes* dans le fromage.

L'inhibition de *Staphylococcus aureus* ou d'*E.coli* producteurs de shigatoxines dans ces produits obéit à une autre logique de biopréservation. Elle doit être effective les premières heures de fabrication et la diversité microbienne à ce stade joue un rôle mineur. Elle repose plutôt sur des activités antagonistes de souches bactériennes individuelles (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*) en lien avec l'acidification, ou la production de métabolites oxydatifs.

Quant à la maîtrise des altérations dans les produits aux communautés microbiennes complexes, elle se raisonne à l'échelle de l'écosystème fromager en actionnant les leviers d'actions technologiques (température, sel, humidité), permettant de piloter tout au long du procédé les équilibres microbiens à l'origine du défaut. Celui-ci résulte souvent de la dominance de populations indésirables plutôt que de leur seule présence. La maîtrise doit débiter très en amont par un équilibre microbien *ad hoc* dans le lait, impliquant de raisonner les pratiques d'élevage et de traite.

4.2.2 Sélection de souches bioprotectrices

La biodiversité des fromages au lait cru a permis l'essor des productions industrielles. Les laits et fromages au lait cru sont une bonne ressource en cultures bioprotectrices. Les ferments lactiques isolés de ces produits, de par leur production d'acides et l'abaissement du pH qu'elles engendrent sont les premiers agents de biopréservation dans le procédé fromager. Une abondante littérature décrit des souches de bactéries lactiques de produits laitiers traditionnels ayant le potentiel génétique pour produire des bactériocines ou qui en produisent en milieu de laboratoire (Dal Bello *et al.*, 2010). Cependant, ces potentialités ne sont encore que peu exploitées en application et peu de cultures protectrices sont actuellement mises sur le marché pour les fromages. Les freins sont inhérents à leur faible efficacité dans les produits (dégradation, adsorption de matières grasses et de la surface deglobules protéiques, distribution hétérogène, compétition avec les flores autochtones ou antagonisme vis-à-vis des ferments lactiques, comportement dans l'écosystème en lien avec les conditions environnementales comme le pH ou la température), à la résistance des souches pathogènes aux bactériocines, et enfin à leur statut d'innocuité (Deegan *et al.*, 2006 ; Grattepanche *et al.*, 2008 ; Sobrino-lopez et Martin-Belloso, 2008). Seule l'utilisation de la nisine, une bactériocine à effet anti-bactérien, comme additif ou de souches de *L. lactis* productrices de nisine sont sur le marché (Deegan *et al.*, 2006). La nisine, commercialisée comme poudre concentrée est inscrite sur la liste des additifs alimentaires approuvée par la FAO/OMS (cf *codex alimentarius*). Elle n'est cependant pas autorisée pour les fromages sous signe de qualité.

La biopréservation des fromages doit être raisonnée à l'échelle de l'écosystème fromage pour créer des synergies avec les barrières associées à des facteurs intrinsèques (richesse en nutriments, vitamines, a_w , potentiel redox, NaCl...) et extrinsèques (environnement gazeux, température, hygrométrie) aux fromages. Par exemple, une inhibition accrue de *L. monocytogenes* en présence d'un consortium bactérien anti-Listéria a pu être augmentée en diminuant l'hygrométrie des caves de 97% à 93% et en augmentant la température de 9 à 13°C pour favoriser les bactéries lactiques. Par contre, en absence de consortium complexe, l'augmentation de température favorise la croissance du pathogène (Callon *et al.*, 2011b).

La combinaison qualitative et quantitative de ces facteurs, qui peuvent agir séquentiellement dans le procédé doit assurer la sécurité sanitaire sans altérer les qualités sensorielles des fromages. Leur intensité doit être adaptée aux niveaux des micro-organismes et à l'objectif à atteindre (réduction, destruction). La connaissance de la réponse du micro-organisme ciblé permettra de développer une approche visant plusieurs cibles, en affectant simultanément le matériel génétique et enzymatique, et l'homéostasie.

Comprendre l'expression des potentialités antagonistes vis-à-vis des populations indésirables des souches dans un écosystème complexe tel que le fromage est un défi pour la recherche. Les potentialités antagonistes de souches sont de plus en plus facilement identifiées grâce à la connaissance des génomes microbiens. Mais dans sa démarche, la biopréservation, doit être capable d'intégrer simultanément la multitude d'interactions positives (commensalisme, synergie et mutualisme) ou négatives (compétition et antagonisme) entre les micro-organismes, la complexité de la matrice biochimique, la diversité des conditions environnementales. Elle doit aussi être vigilante dans les voies

qu'elle ouvre pour l'exploitation de la biodiversité qui doit se faire dans le respect des ressources biologiques des produits alimentaires traditionnels dont la valeur patrimoniale est reconnue.

5. Interactions microbiennes au sein des produits laitiers

5.1. Avancées récentes permettant d'appréhender les interactions

Les interactions entre microorganismes dans les produits laitiers (et dans les aliments fermentés en général) ont fait, très tôt, l'objet de nombreuses études tant ces interactions sont primordiales pour le bon déroulement des processus fermentaires et pour assurer les qualités organoleptiques et sanitaires des produits finis. Ces études ont d'abord été descriptives mais ces dernières années, elles ont bénéficié d'avancées importantes en termes de techniques d'investigation. Le développement des approches « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique et maintenant métabolomique) permettent désormais des approches moléculaires globales et, de fait, une meilleure compréhension des interactions entre microorganismes et de leurs conséquences sur les produits laitiers.

Quelques résultats récents sont présentés ci-dessous, en distinguant les interactions intervenant dans la fabrication et le développement des qualités organoleptiques des produits et celles intervenant dans la qualité sanitaire des produits.

5.2. Interactions microbiennes impliquées dans le développement des qualités organoleptiques

Les qualités organoleptiques des produits laitiers fermentés résultent pour l'essentiel de l'activité des microorganismes intervenant dans les processus fermentaires et cette activité est elle-même grandement modulée par les interactions microbiennes établies au sein des produits. A ce titre, l'écosystème le plus simple, le yaourt, associant deux bactéries lactiques, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* est probablement l'un des systèmes les mieux étudiés.

Une interaction positive entre *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* appelée proto-coopération (i.e. association bénéfique mais pas indispensable au développement de chacune des espèces) a été décrite dans le yaourt. Cette proto-coopération a d'abord été caractérisée par des approches microbiologiques et sous des aspects technologiques : vitesse et niveau d'acidification, biomasse des deux espèces, production d'agents texturants, stabilité des produits finis... Elle est aujourd'hui abordée au niveau moléculaire par des travaux qui ont d'abord établi la séquence des génomes de *S. thermophilus* (Bolotin *et al.*, 2004) et *L. bulgaricus* (van de Guchte *et al.*, 2006). Ces analyses génomiques ont mis en évidence à la fois une « domestication » des souches et une adaptation au contexte laitier (perte de nombreux gènes), de probables transferts de gènes inter-espèces et une complémentarité de fonctions et de voies métaboliques (une souche produisant des métabolites nécessaires à l'autre comme intermédiaires métaboliques). Ces études ont été ensuite complétées par des approches post-génomiques (analyses des transcriptomes et protéomes des deux espèces seules ou en co-culture) précisant la nature et la dynamique de ces interactions dans le lait. Ces dernières ont révélé des interactions insoupçonnées jusqu'alors, impliquant notamment des échanges nutritionnels (Herve-Jimenez *et al.*, 2009 ; Sieuwerts *et al.*, 2010).

Les récentes investigations sur la composition des écosystèmes microbiens complexes de divers fromages combinées à la disponibilité de ces nouvelles approches ont éveillé l'intérêt de la communauté scientifique et l'ont amené à appréhender de façon mécanistique les interactions au sein des écosystèmes fromagers. Il résulte notamment de ces découvertes un intérêt croissant pour le rôle et l'impact de la diversité microbienne des flores de surface des fromages (incluant des bactéries mais

aussi des levures) sur les qualités organoleptiques du produit à l'issue de l'affinage (Larpin-Laborde *et al.*, 2011 ; Deetae *et al.*, 2009). Ainsi plusieurs études récentes évaluent l'impact des interactions entre des espèces de bactéries à Gram négatif et des consortia de levains fromagers complexes sur les qualités sensorielles de fromages de diverses technologies : pâte pressée ou pâte molle (Delbès-Paus *et al.*, 2012 ; Irlinger *et al.*, 2012). Dans ces études sont évalués les bénéfices (incidence sur les qualités organoleptiques) mais aussi les risques (production d'amines biogènes) associés à la présence et à l'utilisation de ces bactéries à Gram négatif dans les fabrications fromagères.

5.3. Inhibition de la croissance des pathogènes dans l'aliment

L'action inhibitrice des bactéries lactiques sur la croissance de bactéries pathogènes alimentaires est maintenant très documentée et a fait l'objet de nombreuses publications relatant les mécanismes mis en œuvre et la prise en compte de ces capacités inhibitrices pour la sélection de levains lactiques performants alliant qualité organoleptique et sanitaire. On peut distinguer une action directe contre les pathogènes par la production de composés inhibiteurs comme, par exemple, les bactériocines ou le peroxyde d'hydrogène, et une action indirecte résultant de la croissance même des bactéries lactiques et de l'acidification du milieu et la compétition nutritionnelle qui en découlent (Mounier *et al.*, 2008 ; Charlier *et al.*, 2009).

Cette inhibition de croissance a été abordée en milieu lait ou au sein de fromages par des fabrications tests expérimentalement contaminées en pathogènes tels que *L. monocytogenes* (Callon *et al.*, 2011a), *E. coli* O157:H7 (Vernozy-Rozand *et al.*, 2005), *S. aureus* (Delbès-Paus *et al.*, 2010) ou *Bacillus cereus* (Rossland *et al.*, 2005).

5.4. Inhibition de l'expression de la virulence des pathogènes

Dans les produits laitiers, il est admis que les bactéries lactiques exercent une activité inhibitrice à l'encontre des pathogènes toxigènes potentiels tels que *S. aureus* ou *B. cereus*. L'inhibition de croissance (et l'éradication de la contamination) reste un objectif prioritaire. Cependant, il a été récemment montré que la capacité d'inhibition des bactéries lactiques peut aussi s'exercer sur l'expression de la virulence du pathogène, en l'occurrence, sur la production d'entérotoxines dans le produit laitier. Ces études sont intéressantes et importantes dans la mesure où, contrairement à d'autres pathogènes comme *Salmonella* ou *Listeria*, l'évaluation du risque lié aux bactéries toxigènes revêt un niveau de complexité supplémentaire puisque, au-delà du critère présence-absence du pathogène, il faut être en mesure de contrôler et limiter la production des entérotoxines elles-mêmes qui sont les réelles responsables de la toxi-infection alimentaire.

Ce type d'activités inhibitrices est encore mal documenté. Les réponses transcriptomiques de deux souches modèles de *S. aureus* et *L. lactis*, respectivement, ont donc été investiguées lors d'interaction dans divers contextes. Le transcriptome de *S. aureus* a ainsi été analysé lors de co-cultures avec *L. lactis*. Cette interaction a d'abord été étudiée en milieu chimiquement défini et à pH régulé. La dynamique d'expression génique de *S. aureus* en culture pure a été comparée à celle obtenue en co-culture. Cette analyse montre que l'expression de la plupart des gènes impliqués dans la machinerie cellulaire, la division cellulaire, la biosynthèse de l'enveloppe, les métabolismes des hydrates de carbone et de l'azote et la réponse aux stress était seulement légèrement affectée. Par contre, l'expression de plusieurs gènes de virulence, ceux du locus *agr* et quelques gènes d'entérotoxines (mais pas tous), était fortement affectée par la présence de *L. lactis*. (Evenet *et al.*, 2009). Cette inhibition de la virulence est aussi observée en matrice fromagère (Cretenet *et al.*, 2011a).

Le transcriptome de *L. lactis* a également été analysé en conditions de fabrication fromagère modèle en culture pure et en co-culture avec *S. aureus* (Cretenet *et al.*, 2011a ; 2011b). En co-culture, très peu de

variations ont été observées. Tout se passe comme si *L. lactis* « ne voyait pas » la population de *S. aureus*. Notamment, même à forte concentration, *S. aureus* n'affecte en rien les propriétés technologiques de *L. lactis* (Nouaille *et al.*, 2009).

6. Interactions microbiennes au sein des produits carnés et biopréservation

6.1. Exemples dans des produits fermentés

Lors de l'élaboration du saucisson, le développement en nombre de deux espèces bactériennes particulières conduit à la stabilité microbiologique du produit transformé. Survenant de manière spontanée dans les productions fermières traditionnelles, cette fermentation a été depuis longtemps domestiquée et les ferments bactériens sont produits industriellement et rajoutés dans les mêlées de viande pour en assurer la fermentation. Ces ferments bactériens utilisés sont majoritairement composés d'un mélange de bactéries lactiques (*Lactobacillus*) et de coques à Gram positif et catalase positive (*Staphylococcus*). Dans cette association, les bactéries lactiques sont reconnues pour leur implication majeure dans la fermentation par production d'acide mais aussi pour leur rôle positif sur les qualités sanitaires du produit par inhibition des espèces pathogènes ou d'altération telles que *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *Salmonella* pour les premières, ou *Pseudomonas* ou des entérobactéries pour les secondes. Ces bactéries lactiques ont des propriétés métaboliques, (production d'acide, de peroxyde d'hydrogène, de bactériocine) qui concourent à la fois à la transformation du produit et à sa sécurité sanitaire. Les coques à Gram positif sont connus pour être responsables des arômes typiques de salaison. Le programme de recherches de l'Agence Nationale de la Recherche, Génoférent (2006-2009), a été conduit sur le comportement des ferments laitiers et carnés au sein des matrices alimentaires. De manière tout à fait intéressante, il y a été montré dans le cas des ferments du saucisson que le développement de *L.sakei* (ferment lactique utilisé classiquement en Europe) était stimulé par la présence de l'autre ferment coque à Gram positif, *Staphylococcus xylosus*, et ce uniquement en présence de sel et de nitrate, c'est à dire dans les conditions d'élaboration du saucisson (Goubet *et al.*, 2007). On comprend donc tout le bénéfice qu'il peut en résulter pour le produit fini si l'on stimule ainsi des bactéries à potentiel de biopréservation. Toutefois, si les conditions technologiques de fermentation peuvent favoriser ces actions, elles peuvent dans certains cas aussi limiter le potentiel biopréservant de certaines espèces. Ainsi, dans les produits carnés, les bactériocines peuvent être adsorbées sur des protéines ou des particules de gras qui vont diminuer leur effet inhibiteur (Vignolo et Fadda, 2007). Par ailleurs, la nisine, seule bactériocine à ce jour dont l'addition est autorisée dans les produits alimentaires, est très efficace dans les produits laitiers mais s'est avérée inactive dans les produits carnés. En effet, la présence de glutathion dans la viande rouge semble modifier la conformation de la nisine en intervenant sur sa structure et diminue ainsi son efficacité (Stergiou *et al.*, 2006).

6.2. Exemple dans le carpaccio, diversité des souches et compétition

Les produits carnés frais non transformés hébergent des écosystèmes bactériens très divers. Certaines des espèces présentes, comme *L. sakei*, sont par ailleurs depuis longtemps utilisées pour la fermentation des produits carnés. En conditions de conservation de la viande fraîche à basse température, sous vide notamment, cette espèce est capable de se développer en nombre élevé et de dominer l'écosystème. Ces propriétés en font une bonne candidate pour une utilisation comme bactérie protectrice des produits carnés frais et ont donné lieu à des études approfondies notamment au niveau génomique. Ainsi le séquençage du génome d'une souche isolée de saucisson sec (Chaillou *et al.*, 2005) a mis en lumière les fonctions qui pourraient expliquer ses aptitudes à un développement favorisé dans les produits carnés. Il a également été montré que cette espèce était très diverse et pouvait être

subdivisée en 10 groupes génomiques, ou génotypes, différents (Chaillou *et al.*, 2009). Dans la viande fraîche, carpaccio de bœuf en l'occurrence, plusieurs souches appartenant à des groupes génomiques différents peuvent cohabiter au sein d'un même produit et il existe un lien entre le procédé de production ou de stockage et les génotypes présents (Lucquin *et al.*, 2012).

Les souches représentant ces 10 groupes génomiques montrent des réponses différentes au stress oxydant. L'analyse du comportement de souches appartenant à différents groupes, cultivées en mélanges et soumises à un stress oxydant a révélé qu'une même souche de *L. sakei* peut manifester une réponse au stress oxydant différente selon les souches auxquelles elle est associée : certaines souches peuvent être bénéfiques pour les autres, d'autres se manifestant au contraire sous un angle néfaste (Guilbaud *et al.*, 2012). Il est donc important de pouvoir maîtriser ces phénomènes d'interactions intra espèce dans une perspective d'utilisation de mélange de souches à des fins de bioconservation. L'utilisation de cette diversité a été à la base d'un dépôt de brevet pour un cocktail de souches de *L. sakei* pour la bioprotection du carpaccio (Chaillou *et al.*, 2012).

6.3. Exemple dans le bœuf haché et d'autres viandes

Comme il a été mentionné plus haut, l'idée de ne pas se restreindre à l'utilisation d'une seule souche mais de jouer sur la diversité intra et inter espèce est un concept en émergence dans le domaine de la biopréservation, notamment pour les produits carnés. Dans ce domaine, plusieurs études ont été menées.

Jones *et al* (2008), ont isolé une vaste collection (181) de bactéries lactiques à partir de différentes viandes de porc, bœuf ou agneau. Testées en milieu modèle viande gélosée, six souches (5 *L. sakei* et 1 *L. lactis*) potentiellement inhibitrices de bactéries d'altération de la viande fraîche comme *Brochothrix thermosphacta* ou de bactéries pathogènes (*Listeria*) ont été sélectionnées. En revanche, testées en conditions réelles dans la viande d'agneau, ces souches inhibitrices se sont avérées avoir des profils d'inhibition différents de ceux observés en milieu de laboratoire (Jones *et al.*, 2009). Un cocktail de 3 souches de *L. sakei* inhibitrices s'est avéré capable de se développer dans la viande d'agneau, sans en altérer les qualités sensorielles sans néanmoins être en mesure d'affecter le développement de flore d'altération comme les entérobactéries (Jones *et al.*, 2010).

Feurer *et al* (2012) ont isolé à partir de la flore naturelle de viande de porc, différentes espèces de bactéries lactiques avec lesquelles ont été composés plusieurs cocktails. Ceux-ci ont été utilisés pourensemencer de la viande fraîche et certains d'entre eux se sont montrés efficaces pour limiter le développement de la flore d'altération composée de *B. thermosphacta* et des entérobactéries, en retardant leur croissance voire en limitant leur niveau de développement. Par ailleurs, un autre a été efficace pour limiter le développement de *Listeria* ensemencé dans la viande de porc.

Dans le projet européen ProsafeBeef, une partie des études avait pour but d'évaluer ces pratiques de bioconservation sur la viande de bœuf. Ainsi, 6 cocktails de 3 souches différentes de *L. sakei* ont été testés sur de la viande de bœuf hachée. La plupart des cocktails se sont avérés efficaces pour limiter le développement de *B. thermosphacta*. Un autre de ces cocktails était capable d'affecter le développement de deux souches d'espèces pathogènes : *Salmonella derby* et *E. coli* O157:H7. L'effet observé étant une stabilisation voir une diminution du niveau de ces pathogènes. Par ailleurs, il a également pu être montré que les souches de *L. sakei* qui avaient été rajoutées avaient bien supplanté la flore de *L. sakei* naturelle (Zagorec *et al.*, 2012). En revanche l'effet inhibiteur n'était pas toujours observé, dépendant certainement de la nature de la flore bactérienne endogène.

Ces différentes études apportent des résultats prometteurs pour le développement de pratiques de bioconservation des produits carnés par des mélanges de souches d'une ou plusieurs espèces bactériennes. Néanmoins ils témoignent aussi d'un besoin de connaissances sur les phénomènes d'interactions entre souches afin de pouvoir maîtriser ces pratiques.

Conclusion

- Les nouveaux champs possibles de la biopréservation et les limites :

Les méthodes, notamment de séquençage à haut et très haut débit, permettent maintenant d'avoir une vision bien plus exhaustive des écosystèmes alimentaires. Elles permettent d'investiguer la diversité des espèces présentes dans son ensemble et de manière plus large que celle possible par des méthodes classiques. Cela signifie que des espèces bien que sous dominantes ou présentes jusqu'à 10 000 fois moins que les espèces les plus abondantes peuvent être observées, en même temps que celles qui constituent plus de 99% d'une population microbienne. Dans le cas des aliments fermentés, dont la population microbienne est élevée mais l'abondance en termes d'espèces différentes est relativement faible, il est ainsi possible de considérer également des espèces potentiellement utiles ou indésirables, même lorsqu'elles ne sont pas majoritaires. Dans le cas des produits non fermentés, dont la charge microbienne peut être relativement faible mais présentant une grande abondance d'espèces différentes (jusqu'à plusieurs milliers), les nouveaux champs d'investigation sont très vastes et réserveront certainement quelques surprises.

Il subsiste encore à ce jour une certaine limitation méthodologique à la discrimination entre souches d'une même espèce ou entre souches très proches. Même s'il est connu que la diversité intra-espèce aussi bien au niveau génomique que phénotypique est grande, elle reste encore difficilement accessible. Néanmoins, ces méthodes permettent d'appréhender la biopréservation de manière globale, c'est-à-dire d'étudier l'impact de flores protectrices sur l'écosystème dans son ensemble et non plus seulement sur une flore cible. Cet aspect est encore peu abordé par la communauté scientifique, mais il sera cependant nécessaire de s'y atteler car la dynamique des écosystèmes alimentaires étant maintenant accessible, il faudra veiller à ce que si l'ajout de flores protectrices a bien un effet inhibiteur sur une flore indésirable, il ne risque pas également d'influencer une flore secondaire ni les qualités organoleptiques du produit fini.

- Les futurs champs d'action :

L'étude globale des interactions microbiennes au sein des écosystèmes n'en est qu'à son début. Elle sera cependant nécessaire afin de comprendre et donc de maîtriser l'effet de flores protectrices sur les flores indésirables dans les aliments. Comprendre les effets des activités exprimées par les espèces antagonistes, sur le développement, mais aussi sur l'état de virulence ou l'état physiologique des cibles, dans l'aliment sera garant d'une meilleure utilisation de la biopréservation. De même, connaître les réponses des espèces indésirables (qu'elles soient pathogènes ou altérantes) aux procédés de transformation des aliments, en les replaçant dans le contexte de l'écosystème alimentaire et en présence de flores protectrices devra également être abordé. Pour ce faire, la communauté scientifique commence à investiguer non seulement les espèces microbiennes mais également les fonctions exprimées dans ces ensembles complexes que représentent les écosystèmes alimentaires.

Références bibliographiques

Arumugam M., Harrington E.D., Foerstner K.U., Raes J., Bork P., 2010. SmashCommunity : a metagenomic annotation and analysis tool. *Bioinformatics* (Oxford, England) 26, 2977-2978.

Bleicher A., Obermajer T. Matijasic B.B., Scherer S., Neuhaus K., 2010a. High biodiversity and potent anti-listerial action of complex red smear cheese microbial ripening consortia. *Annals of Microbiology* 60, 531-539.

- Bleicher A., Stark Hofmann T., Matijasic B.B, Rogelj I., Scherer S., and Neuhaus K., 2010b. Potent antilisterial cell-free supernatants produced by complex red-smear cheese microbial consortia. *Journal of Dairy Science* 93, 4497-4505.
- Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich S.D., Kulakauskas S., Lapidus A., Goltsman E., Mazur M., Pusch G.D., et al., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22, 1554-1558.
- Bouton Y. Tessier T., Guyot T.P., Beuvier E., 2005. Relation entre les pratiques des producteurs et le niveaux de population microbienne des laits à Comté. 12^{ème} Rencontre Recherche Ruminants. Institut de l'élevage INRA, 403-403.
- Brosnan B., Coffey A., Elke K., Furey A., 2012. Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Analytical Bioanalysis and Chemistry* 403, 2983-2995.
- Cagno, R.; De Pasquale, I.; De Angelis, M., Gobbetti, M. 2012. Accelerated ripening of Caciocavallo Pugliese cheese with attenuated adjuncts of selected nonstarter lactobacilli. *Journal of Dairy Science* 95, 4784-4795.
- Callon C., Saubusse M., Didienne R., Buchin S., Montel M.C., 2011a. Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *International Journal of Food Microbiology* 145, 379-389.
- Callon C., Picque D., Corrieu G., Montel M.C., 2011b. Ripening conditions, A tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. *Food Control* 22, 1911-1919.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer. N, Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I. et al., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335-336.
- Chaillou S., Champomier-Vergès M.C., Cornet M., Crutz Le Coq A-M., Dudez A-M., Martin V., Beaufils S., Bossy R., Darbon-Rongère E., Loux V., Zagorec M., 2005. Complete genome sequence of the meat-born lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23, 1527-1533.
- Chaillou S., Daty M., Baraige F., Dudez A-M., Anglade P., Jones R., Alpert C-A., Champomier-Vergès M-C., Zagorec M., 2009. Intra-species genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 970-980.
- Chaillou S., Champomier-Vergès M. C., Zagorec M., 2012. Development of *Lactobacillus sakei* strain cocktail for improving the hygienic quality of raw beef meat. Brevet FR N°1257785.28 Août 2012.
- Charlier C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y., 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 131, 30-39.
- Cretenet M., Nouaille S., Riviere J., Gouffier L., Stenz L., Schrenzel J., Hennekinne J.-A., Piot M., Maillard M.-B., Loubière P., Le Loir Y., Even S., 2011a. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. *Environmental Microbiology Reports* 3, 340-351.
- Cretenet M., Laroute V., Ulvé V., Jeanson S., Nouaille S., Even S., Piot M., Girbal L., Le Loir Y., Loubière P., Lortal S., Coccagn-Bousquet M., 2011b. Dynamic analysis of *Lactococcus lactis* transcriptome in UF-cheeses reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 247-257.
- Dal Bello B., Rantsiou K., Bellio A., Zeppa G., Ambrosoli R., Civera T., Cocolin L., 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT -- Food Science and Technology* 43, 1151--1159
- Deetae P., Mounier J., Bonnarne P., Spinnler H.E., Irlinger F., Helinck S., 2009. Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1404-1413.
- Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058-1071.

Delbès-Paus C., Dorchies G., Chaabna Z., Callon C., Montel M.C., 2010 Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. Food Microbiology 27, 924-932.

Delbès-Paus C., Pochet S., Helinck S., Veisseire P., Bord C., Lebecque A., Coton M., Desmasures N., Coton E., Irlinger F., Montel M.C., 2012. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. Food Microbiology 30, 74-82.

Didienne R., Defargues, C. Callon C., Meylheuc T., Hulin S., Montel M.C., 2012. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. International Journal of Food Microbiology 156, 91-101.

ECOBIOPRO. 2011. <http://www.ecobiopro.fr/>

EFSA, 2011. Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, zoonotic Agents and food-borne Outbreaks in 2009. The EFSA Journal 3, 378 pp.

EFSA, 2012. Scientific Opinion on a review on the European Union Summary Reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks. The EFSA Journal 10, 2726.

Eppert I., Valdes-Stauber N., Gotz H., Busse M., Scherer S. 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. Applied and Environmental Microbiology 63, 4812-4817.

Even S., Charlier C., Nouaille S., Ben Zakour N.L., Cretenet M., Cousin F.J., Gautier M., Coccagn-Bousquet M., Loubière P., Le Loir Y., 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* during mixed cultures. Applied and Environmental Microbiology 75, 4459-4472.

Feurer C., Zuliani V., Guizard C., Godin S., Ellouze M., 2012. Use of natural flora of fresh pork as a biopreservation strategy. Proceedings; 23th International ICFMH. Food Micro 2012, Istanbul 4-7 septembre 2012.

Fretz R., Pichler J., Sagel U., Much P., Ruppitsch W., A. T. Pietzka, A. Stoger, Huhulescu S., Heuberger S., Appl G., et al., 2010. Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 15.

Gilbert J.A., Hughes M., 2011. Gene expression profiling: metatranscriptomics. Methods in Molecular Biology 733, 195-205.

Giri C.-P., Shrestha S., Foresmen, Singh A., 1992. Global diversity data and information report World Conservation Monitoring Centre, 1-29.

Goubet A., Zuliani V., Feuer C., Romey A., Guizard C., Leroy S., Frisoni-Dordet E., Talon R., Daty M., Baraige F., Champomier-Vergès M.-C., Chaillou S., Zagorec M. 2007. Interactions entre ferments du saucisson : effet positif de *Staphylococcus xylosus* sur *Lactobacillus sakei*. 15^{ème} Réunion du Club des Bactéries Lactiques, Rennes, Nov 2007. Communication et résumé.

Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., et al., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology 29, 644-652.

Grattepanche F., Miescher-Schwenninger S., Meile L., Lacroix C., 2008. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. Dairy Science and Technology 88, 421-444.

Guilbaud M., Zagorec M., Chaillou S., Champomier-Vergès M.-C., 2012. Intraspecies diversity of *Lactobacillus sakei* response to oxidative stress and variability of strain performance in mixed strains challenges. Food Microbiology 29, 197-204.

- van de Guchte M., Penaud S., Grimaldi C., Barbe V., Bryson K., Nicolas P., Robert C., Oztas S., Mangenot S., Couloux A., et al., 2006 The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 9274-9279.
- Hain T., Chatterjee S.S., Ghai R., Kuenne C.T., Billion A., Steinweg C., Domann E., Karst U., L. Jansch, Wehland J., et al., 2007. Pathogenomics of *Listeria* spp. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 541-557.
- Hamady M., Walker J.J., Harris J.K., Gold N.J., Knight R., 2008. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* 5, 235-237.
- Herve-Jimenez L., Guillouard I., Guedon E., Boudebouze S., Hols P., Monnet V., Maguin E., Rul F., 2009. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2062-2073.
- vanHijum S.A.F.T., Vaughan E.E., Vogel R.F., 2012. Application of state-of-art sequencing technologies to indigenous food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 24, in press.
- Humblot C., Guyot J-P., 2009. Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4354-4361.
- Illegheems K., De Vuyst L., Papalexandratou Z., Weckx S., 2012. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS One* 7, e38040.
- Imran M., Desmaures N., Vernoux J.P., 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiology* 27, 1095-1103.
- Irlinger F., Yung S.A., Sarthou A.S., Delbès-Paus C., Montel M.C., Coton E., Coton M., Helinck S., 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 332-338.
- Janda J.M., Abbott S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2761-2764.
- Jones R.J., Hussein H.M., Zagorec M., Brightwell G., Tagg J.R., 2008. Isolation of lactic-acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology* 25, 228-234.
- Jones R.J., Zagorec M., Tagg J., 2009. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. *Food Microbiology* 26, 876-881.
- 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.
- Jung J.Y., Lee S.H., Kim J.M., Park M.S., Bae J.W., Hahn Y., Madsen E.L., Jeon C.O., 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2264-2274.
- Kiyohara M., Koyanagi T., Matsui H., Yamamoto K., Take H., Katsuyama Y., Tsuji A., Miyamae H., Kondo T., Nalamura S., Katayama T., Kumagai H., 2012. Changes in microbiota population during fermentation of *Narezushi* as revealed by pyrosequencing analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 76, 48-52.
- Kostinec M., Specht I., Edward V.A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., 2007. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 342-351.
- Lan A., Bruneau A., Herve C., Roland N., Rabot, S., Jan, G., 2007. Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. *British Journal of Nutrition* 97, 714-724.

- Larpin-Laborde S., Imran M., Bonaïti C., Bora N., Gelsomino R., Goerges S., Irlinger F., Goodfellow M., Ward A.C., Vancanneyt M., *et al.*, 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 651-660.
- Leistner L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
- Lucquin I., Zagorec M., Champomier-Vergès M.C., Chaillou S., 2012. Taxonomic structure of lactic acid bacteria community in non-fermented beef meat ecosystems and natural population dynamic of the meat starter species *Lactobacillus sakei* assessed by genotype fingerprinting. *Food Microbiology* 29, 187-196.
- Mallet A., Guéguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboué A., Desmasure N., 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27, 13-21.
- Maoz A., Mayr R., Scherer S., 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4012-4018.
- Mariani C., Oulahal N., Chamba J. F., Dubois-Brissonnet F., Notz E., Briandet R., 2011. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* 22, 1357-1362.
- Masoud W., Vogensen F.K., Lillevang S., Abu Al-Soud W., Sørensen S.J., Jakobsen M., 2012. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 153, 192-202.
- Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A. *et al.*, 2008. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9, 386.
- Millet L., Saubusse M., Didienné R., Tessier L., Montel M.C., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 108, 105-114.
- Monnet C., Bleicher A., Neuhaus K., Sarthou A. S., Leclercq-Perlat M. N., Irlinger F., 2010. Assessment of the anti-listerial activity of microfloras from the surface of smear-ripened cheeses. *Food Microbiol* 27, 302-310.
- Mounier J., Monnet C., Vallaëys T., Arditi R., Sarthou A.S., Hélias A., Irlinger F., 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 172-181.
- Nam Y.D., Chang H.W., Kim K.H., Roh S.W., Bae J.W., 2009. Meta-transcriptome analysis of lactic acid bacteria during kimchi fermentation with genome-probing microarrays. *International Journal of Food Microbiology* 130, 140-146.
- Nieminen T.T., Koskinen K., Laine P., Hultman J., Sæde E., Paulin L., Paloranta A., Johansson P., Björkroth J., Auvinen P., 2012. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *International Journal of Food Microbiology* 157, 142-149.
- Nouaille S., Even S., Le Loir Y., Loubière P., Coccagn-Bousquet M., 2009. Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4473-4482.
- Park E.-J., Chun J., Cha C.-J., Park W.-S., Jeon C.O., Bae J.-W., 2012. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiology* 30, 197-204.
- Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J., 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry* 55, 856-866.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., *et al.*, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65.

- Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D., 2012. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5717-23.
- Ravyts F., De Vuyst L., Leroy F., 2012. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *English Life Science* 12, 356-367.
- Retureau, E., Callon C., Didienne R., Montel M.C., 2010. Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? *Dairy Science and Technology* 90, 375--398.
- Roh S.W., Kim K-H., Nam Y-D., Chang H-W., Park E-J., Bae J-W., 2010. Investigation of archeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *The ISME Journal* 4, 1-16.
- Røssland E.T., Langsrud T., Sørhaug T., 2005. Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 69-77.
- Roth E., Miescher-Schwenninger S., Hasler M., Eugster-Meier E., Lacroix C., 2010 Population dynamics of two antilisterial cheese surface consortia revealed by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *BMC Microbiology* 10, 74.
- Roth E., Schwenninger S. M., Eugster-Meier E., Lacroix.C., 2011. Facultative anaerobic halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from a natural smear ecosystem inhibit *Listeria* growth in early ripening stages. *International Journal of Food Microbiology* 147, 26-32
- Sakamoto N., Tanaka S., Sonomoto K., Nakayama J., 2011. 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. *International Journal of Food Microbiology* 144, 352-359.
- Saubusse, M., Millet L., Delbes C., Callon C., Montel M. C., 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116, 126--135.
- Sieuwerds S., Molenaar D., van Hijum S.A., Beerthuyzen M., Stevens M.J., Janssen P.W., Ingham C.J., de Bok F.A., de Vos W.M., van HylckamaVlieg J.E., 2010. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7775-7784.
- Sobrino-Lopez A., Martin-Belloso, O., 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal* 18, 329-343
- Statley J.T., Konopka A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 39, 321-346.
- Stergiou V., Thomas L.V., Adams M.R., 2006. Interactions of nisin with glutathione in a model protein system and meat. *Journal of Food Protection* 69, 951-956.
- Stiles M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345.
- Suenaga H., 2012. Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental Microbiology* 14, 13-22.
- Temperton B., Giovannoni S.J., 2012. Metagenomics: microbial diversity through a scratched lens. *Current Opinion in Microbiology* 15, 1-8.
- Turgay M., Irmiler S., Isolini D., Amrein R., Fröhlich-Wyder M.-T., Berthoud H., Wagner E., Wechsler D., 2011. Biodiversity, dynamics, and characteristics of *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss Emmentaler PDO cheese. *Dairy Science and Technology* 91, 471-489.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy-Cruchaudet C., Bavai C., Montet M.P., Bonin V., Dernburg A., Richard Y., 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 83-88.
- Vignolo G., Fadda S., 2007. Starter cultures: bioprotective cultures. In *Handbook of fermented meat and poultry*. F. Toldra Ed. ISBN: 978-0-8138-1477-3. Blackwell. p. 147-157.
- Weckx S., Allemeersch J., Van der Meulen R., Vrancken G., Huys G., Vandamme P., Van Hummelen P., De Vuyst L., 2011. Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 618-626.

Westby A., Reilly A., Bainbridge Z., 1994. Review of the effect of fermentation on naturally occurring toxins. *Food Control* 10, 329-339.

Yamada T., Letunic I., Okuda S., Kanehisa M., Bork P., 2011.iPath2.0: interactive pathway explorer. *Nucleic Acids Research* 39, W412-W415.

Zagorec M., Chaillou S., Champomier-Vergès M.C., Lucquin I., Rivollier M., Christieans S., 2012. Bioprotective cultures. *Technowledge* 11. <http://www.prosafebeef.com/>.