



HAL
open science

Du génome de *Lactobacillus sakei* à la bioconservation des produits carnés

Monique Zagorec, Stephane Chaillou, Marie-Christine Champomier-Verges,
Anne-Marie Le Coq

► **To cite this version:**

Monique Zagorec, Stephane Chaillou, Marie-Christine Champomier-Verges, Anne-Marie Le Coq. Du génome de *Lactobacillus sakei* à la bioconservation des produits carnés. La revue française de la recherche en viandes et produits carnés, 2006, 25 (3), pp.1-3. hal-01190029

HAL Id: hal-01190029

<https://hal.science/hal-01190029>

Submitted on 1 Sep 2015

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.

Le muscle, naturellement stérile, est inévitablement contaminé par des bactéries lors de la dépouille et de l'éviscération des animaux puis lors des différentes étapes de préparation des carcasses et de la viande. Cette contamination, à terme, peut provoquer l'altération du produit ou des toxi-infections. Si bien sûr les bactéries pathogènes ou d'altération sont à proscrire ou au moins à limiter, il en est une autre dont la présence peut avoir un intérêt certain: *Lactobacillus sakei*, est une bactérie lactique non pathogène communément trouvée sur la viande fraîche et qui devient la flore dominante de la viande conservée sous vide et à basse température. Un développement trop important de *L. sakei* n'est pas souhaité car il entraînerait la fermentation lactique du produit, mais sa présence est pourtant à privilégier dans la mesure où elle peut empêcher le développement d'autres espèces indésirables (pathogènes ou d'altération) sans avoir d'incidence marquée sur la qualité organoleptique de la viande. L'idée d'utiliser ce type de bactérie comme " culture bioprotectrice " a été émise il y a plusieurs années. Cependant, un tel usage n'est pas encore bien maîtrisé et jusqu'à présent la méconnaissance des mécanismes mis en jeu pour qu'une espèce bactérienne joue ce rôle de bio-conservation empêchait de progresser dans ce domaine. L'analyse du génome d'une souche de *L. sakei* donne les pistes à suivre.

LACTOBACILLUS SAKEI

Lactobacillus sakei, bactérie lactique non pathogène, doit son nom exotique à la découverte de sa présence fortuite dans de l'alcool de riz en 1934 (Katagiri et al., 1934). Pendant de nombreuses années, elle n'est plus citée et ce n'est que dans les années 80 qu'elle recommence à apparaître dans la littérature. Son nom initial est d'ailleurs *Lactobacillus sake*, il ne sera latinisé qu'en 1997 selon les recommandations internationales et les codes de la systématique bactérienne (Trüpper et de Clari, 1997). Il y a environ 25 ans, les chercheurs commencent à s'intéresser plus particulièrement à la flore des produits carnés. Ils mentionnent qu'ils isolent des bactéries que l'on peut classer parmi les bactéries lactiques, voire dans le genre *Lactobacillus*, mais auxquelles on ne peut attribuer de véritable nom d'espèce tant leur hétérogénéité phénotypique est grande et qui ne s'apparentent complètement à aucune des espèces de lactobacilles connus. Elles montrent des similitudes avec *L. sake* et une autre espèce proche *Lactobacillus curvatus*. Cela leur vaudra l'appellation générique de streptobactéries atypiques qui est celle qui prévaut dans les publications des années 80.

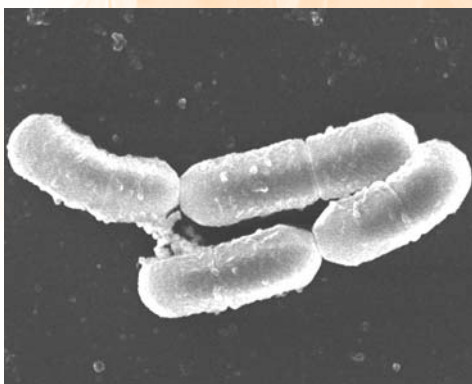


Figure 1

Cellules de *Lactobacillus sakei* lors de la croissance en milieu liquide, visualisées par microscopie électronique à balayage.

La longueur des bacilles est d'environ 1 µm

Une bactérie adaptée à la viande

Du génome de *Lactobacillus sakei* à la bio-conservation des produits carnés

***Lactobacillus sakei* est une bactérie lactique bien adaptée à la viande. Elle représente la flore dominante de la viande conservée sous vide et est communément utilisée pour la fabrication de saucissons secs. Le séquençage de son génome a permis de mieux comprendre cette adaptation et ouvre des pistes pour développer de nouvelles utilisations de cette bactérie pour conserver la viande fraîche.**

ZAGOREC M., CHAILLOU S., CHAMPOMIER-VERGES M.C., CRUTZ-LE COQ A.-M.

Inra, Domaine de Vilvert
Unité Flore lactique et Environnement carné
78352 JOUY-EN-JOSAS Cedex

Science et technique



Avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire dans les années 90, les méthodes d'identification bactérienne évoluent et une place prépondérante est donnée aux critères génétiques. Ainsi une définition génomique de l'espèce bactérienne est proposée et reconnue : une espèce bactérienne rassemble des bactéries dont les ADN présentent 80 % d'homologie. Utilisant ces critères, les chercheurs montrent alors que toutes ces souches atypiques de la viande appartiennent bien à l'espèce *L. sakei*, en dépit de leurs différences phénotypiques (Champomier et al., 1987). C'est cette espèce qui est régulièrement isolée des produits carnés frais et principalement de la viande conservée sous vide où elle devient dominante. C'est aussi elle qui se développe spontanément lors de la fabrication d'un saucisson sec traditionnel non ensemencé. Pour ces raisons, elle est utilisée industriellement comme ferment pour la production des saucissons secs (Hammes et al., 1990; Hammes et Hertel, 1998). La découverte récente (Dal Bello et al., 2003) de la présence de cette bactérie dans les fèces humaines de sujets sains suggère qu'il s'agit certainement d'une vieille compagne de l'homme. Son origine est certainement alimentaire et cette découverte conforte l'idée de son innocuité vis à vis l'homme.

Plusieurs laboratoires, essentiellement en Europe, ont étudié la physiologie de cette espèce bactérienne et en particulier des fonctions métaboliques mises en jeu lors de sa croissance ou de sa survie sur la viande. Des outils moléculaires et des méthodes spécifiques ont également été mis au point pour ces études. La

production de peptides à effet antagoniste, des bactériocines, est connue depuis longtemps et certaines souches de *L. sakei* sont productrices de sakacines à effet anti-*Listeria monocytogenes*. La production des sakacines A, G, M et P a été étudiée. Ainsi, au cours des 15 dernières années les connaissances acquises sur *L. sakei* ont rendu cette bactérie moins exotique (pour revue voir Champomier-Vergès et al., 2002). Le séquençage du génome complet de la souche *L. sakei* 23K permet de tourner une nouvelle page et va certainement conduire à de nouvelles applications (Chaillou et al., 2005; Eijsink et Axelsson, 2005).

LES CULTURES BIOPROTECTRICES ET LA BIOCONSERVATION

De nombreux produits fermentés entrent dans notre alimentation et à l'origine, la fermentation était un procédé essentiellement destiné à la conservation des aliments. Qu'il s'agisse de la fermentation de la viande en saucisson, du lait en fromage ou du chou en choucroute, un élément commun est l'implication de bactéries qui vont dégrader les sucres présents dans le produit frais pour conduire à la production d'acide lactique qui entraîne une baisse de pH, ralentissant le développement de nombreux micro-organismes et assurant ainsi la conservation d'un produit microbiologiquement sain. On peut donc considérer que la fermentation fait partie des procédés de bioconservation. Cependant elle entraîne une transformation du produit frais (goût, couleur, texture). Dans le concept d'utilisation de cultures protectrices à

des fins de bioconservation, l'effet recherché est d'assurer la qualité microbiologique sans modification organoleptique du produit, de manière à lui préserver son caractère frais. Ceci implique donc l'utilisation de bactéries, inoffensives pour la santé de l'homme, qui vont empêcher le développement d'autres espèces bactériennes indésirables sans modifier la matrice alimentaire. Si la recherche pour la mise au point de bonnes cultures protectrices se développe depuis plusieurs années, la difficulté majeure réside dans le fait que la compétition entre les différentes espèces bactériennes sur des substrats alimentaires complexes résulte d'un ensemble de mécanismes encore mal compris (Devlieghere et al., 2004). En ce qui concerne les produits carnés, la viande destinée à être consommée crue ou peu cuite (steaks tartare ou haché, carpaccio par exemple) ou les plats cuisinés sont ceux qui peuvent présenter des problèmes importants de contamination avec une incidence sur la santé du consommateur. En effet, dans le cas des produits consommés crus ou peu cuits, les bactéries pathogènes ne sont pas détruites par la cuisson et dans le cas des produits cuisinés, rendus stériles par leur cuisson préalable, une contamination ultérieure peut être dangereuse car en absence d'espèce compétitrice, les bactéries nouvellement contaminantes peuvent se développer jusqu'à un degré élevé. C'est donc essentiellement sur ces types de produits que la recherche sur les cultures protectrices des produits carnés s'est développée (Bredholt et al., 2001; Vermeiren et al., 2004; Vold et al., 2000). Il a été observé que la flore endogène de la viande, et en particulier *L. sakei*, contribuait à empêcher le développement de bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli* O157:H7 dans la viande hachée. Des essais réalisés à l'aide de souches productrices de bactériocines anti-*Listeria* ont montré qu'elles limitaient le développement des *Listéria* sur des produits carnés cuits. Cependant, l'efficacité des bactériocines dans les matrices alimentaires reste peu maîtrisée et l'éventail des cibles est limité à quelques espèces bactériennes. L'utilisation de *L. sakei* comme culture protectrice des produits carnés semble donc être une piste à suivre, mais nécessite au préalable une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels elle peut conduire à limiter le développement d'autres espèces sur la viande.



Figure 2

La viande rouge, le saucisson sec et des produits comme le saumon fumé sont des aliments dans lesquels on peut trouver *L. sakei*. ©INRA — Bertrand NICOLAS

LA STRATÉGIE D'ANNOTATION DU GÉNOME DE *L. SAKEI*

L'analyse d'un génome consiste à extraire de la séquence d'ADN les informations qu'elle contient. Il s'agit de détecter les gènes, puis dans la mesure du possible de prédire la fonction que chacun d'entre eux code. Plusieurs méthodes d'analyse informatique permettent de détecter par exemple des motifs sur l'ADN (séquences d'ADN représentant des signaux de transcription ou de traduction, détection des régions codantes, indication de l'utilisation de codons particuliers...). On peut aussi, à partir des séquences protéiques déduites de l'ADN rechercher des motifs ou des similarités avec d'autres protéines (présence d'un peptide signal ou de régions trans-membranaires augurant d'une localisation extracellulaire ou membranaire, motifs caractéristiques de régulateurs, similarité avec des protéines de fonction connue...). L'annotation d'un génome consiste en l'analyse par les biologistes des données disponibles pour chacun des gènes afin de prédire leur fonction. Une chaîne d'annotation regroupant différentes méthodes d'analyse informatique réalisées automatiquement à partir de la séquence d'un génome bactérien a été développée par l'unité Mathématique, Informatique et Génome (MIG) de l'Inra de Jouy-en-Josas. Nous avons séquencé le génome de *L. sakei* 23K (composé de 1 884 661 paires de base) puis analysé les données obtenues pour chacun des 1883 gènes détectés. La question principale à laquelle nous souhaitions répondre était de savoir ce qui, dans ce génome, permettait d'expliquer pourquoi *L. sakei* est si bien adaptée à la viande, s'y développe et réduit le développement d'autres espèces concurrentes. Nous avons donc considéré la viande comme un substrat nutritif, c'est-à-dire contenant des nutriments permettant le développement de *L. sakei* et d'autres espèces connues. Nous avons aussi considéré que la viande, lors de sa conservation par différentes méthodes était un environnement stressant pour les bactéries (ajout de sel, d'épices, fumaison, basse température, hypoxie lors de la conservation sous-vide...). Enfin, nous avons considéré que la viande constituait un écosystème bactérien dans lequel certaines espèces entraînent ou non en compétition et nous avons en conséquence analysé le génome de *L. sakei* en tenant compte aussi des caractéristiques d'autres espèces capables de se trouver sur le même environnement et pour lesquelles le génome était connu (*E. coli*, *L. monocytogenes*,

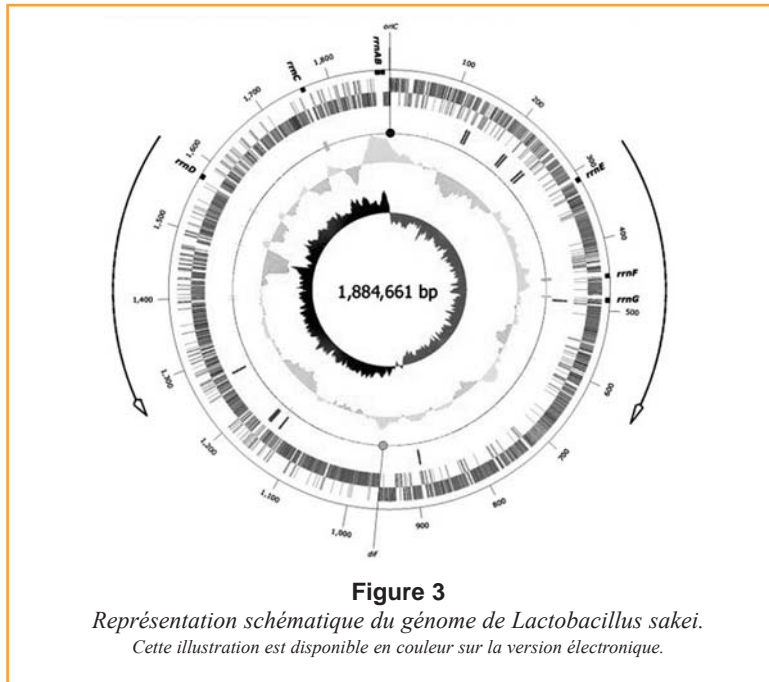


Figure 3

Représentation schématique du génome de *Lactobacillus sakei*. Cette illustration est disponible en couleur sur la version électronique.

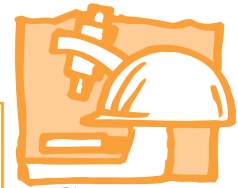
Enterococcus faecalis, *Lactobacillus plantarum* pour exemple).

L'APPORT DE LA CONNAISSANCE DU GÉNOME

L'annotation du génome de *L. sakei* 23K nous a permis de mettre en évidence quelques grands traits caractéristiques de cette espèce qui permettent de mieux comprendre son adaptation. Ces résultats sont développés dans la publication correspondante (Chaillou et al., 2005) mais peuvent se résumer en trois points principaux : (1) elle peut tirer partie de la viande comme substrat nutritif mieux que certaines autres espèces, (2) elle peut résister mieux que d'autres aux conditions stressantes de conservation de la viande, et (3) elle semble être capable de produire des molécules toxiques pour d'autres espèces bactériennes et de résister à certaines produites par ses concurrentes. Quelques exemples sont développés ci-dessous. Les bactéries utilisent en général des sucres comme source de carbone et d'énergie pour leur développement. La viande contient de faibles quantités de glucose (provenant de la dégradation du glycogène). Par ailleurs, les acides nucléiques sont dégradés en différents composés comme l'AMP, l'adénosine, l'IMP, l'inosine et finalement le ribose. Les bactéries utilisent en général le glucose comme sucre préférentiel. L'analyse du génome a révélé que cette bactérie possède peu de transporteurs pour les sucres rapidement métabolisables mais est capable d'utiliser le ribose et l'inosine comme source de carbone. Expérimentalement, nous avons observé que la présence de faibles quan-

tités de glucose favorisait l'utilisation de ribose et d'inosine. La capacité à utiliser l'inosine existe aussi chez *E. coli*, mais peut-être pas chez *L. monocytogenes*. On peut alors imaginer l'avantage que procure cette propriété : pendant que certaines espèces sont en compétition pour utiliser le glucose afin de se développer, *L. sakei* peut aussi utiliser d'autres sources de carbone alternatives pour lesquelles elle n'a que peu de compétiteurs, ce qui rend sa dépendance pour le glucose moins vitale.

Un second exemple réside dans l'utilisation du fer et de l'hème (groupement prosthétique des cytochromes, de la myoglobine et de l'hémoglobine contenant un atome de fer), composés présents dans la viande. *L. sakei* a longtemps été considérée comme une bactérie ne nécessitant ni fer ni hème. En réalité, une catalase fonctionnant à l'hème a été décrite chez *L. sakei* il y a plusieurs années, mais *L. sakei* semblait incapable de synthétiser l'hème. Le génome de *L. sakei* a confirmé l'absence de voie de biosynthèse de l'hème mais a montré qu'elle possédait plusieurs enzymes nécessitant l'hème pour être actives. Plusieurs transporteurs du fer et un transporteur potentiel de l'hème ainsi que des régulateurs et des enzymes connues pour nécessiter du fer sont aussi codés par ce génome. Il est donc vraisemblable que *L. sakei* utilise le fer et l'hème présents sur la viande. Le fer est aussi un élément essentiel à de nombreuses bactéries et est notamment important pour l'expression de la virulence chez plusieurs bactéries pathogènes (dont *L. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* parfois présents



Science et
Technique



sur la viande). Une compétition pour le fer et l'hème pourrait être un bon moyen pour mieux contrôler la microflore de la viande.

Un troisième exemple concerne la capacité de *L. sakei* à utiliser les acides aminés. La viande est un composé riche en protéines, peptides et acides aminés. *L. sakei* 23K ne possède pas de protéase extracellulaire, activité assurée par les cellules musculaires lors de la maturation de la viande, ni aucune voie complète de biosynthèse d'acides aminés. En revanche, elle possède de nombreux transporteurs pour importer des peptides et des acides aminés, ainsi que des peptidases, l'ensemble lui permettant de pallier son incapacité de synthétiser les acides aminés.

En complément de ces exemples d'adaptation au substrat, elle possède des capacités d'adhésion à différents composés de la viande qui doivent lui permettre de bien coloniser la matrice carnée.

Nous avons aussi noté plusieurs fonctions qui doivent permettre à *L. sakei* de bien résister aux conditions de conservation de la viande.

Par exemple, elle possède la même panoplie que *L. monocytogenes* pour transporter des osmoprotectants (dont la carnitine présente dans la viande) qui permettent de résister au sel et au froid. Elle possède aussi des enzymes de détoxification pour résister à certaines molécules bactéricides résultant par exemple de l'ajout de certaines épices ou de traitements comme la fumaison. D'autres espèces également présentes sur la viande semblent moins bien équipées. Mais, c'est surtout en ce qui concerne l'adaptation à la présence

d'oxygène et à ses variations que *L. sakei* se distingue. Elle présente une panoplie assez large de protéines qui lui permettent de mieux résister aux stress provoqués par l'oxygène et ses dérivés. Ceci met en exergue une grande capacité à s'adapter et résister aux variations de potentiel rédox. Après l'environnement anaérobie du tube digestif des animaux, *L. sakei* peut être confrontée à une soudaine oxygénation sur le cuir animal ou à la surface de la viande, puis elle peut être en hypoxie (conservation sous vide) et soumise à nouveau à une forte oxygénation lors du hachage de la viande par exemple. Il est alors aisé de comprendre que par rapport à ses concurrentes moins bien adaptées, cette bactérie survit et se développe malgré ces grandes variations.

Enfin, *L. sakei* posséderait aussi la particularité de produire des molécules empêchant le développement d'autres espèces de bactéries. Plusieurs souches de *L. sakei* sont connues pour produire des bactériocines. La souche 23K n'en produit pas mais a conservé une partie de l'opéron responsable de la synthèse de sakacine P. L'opéron est remanié et plusieurs petits gènes similaires à des gènes d'immunité aux bactériocines sont présents. La souche 23K est sensible à la sakacine P mais pourrait bien être résistante à d'autres bactériocines produites par des espèces compétitrices proches de *L. sakei* (*L. plantarum*, Entérocoques, Carnobactéries, *Listérias*). Par ailleurs, *L. sakei* 23K produirait d'autres molécules antagonistes: de l'acide lactique (produit en général par les bactéries lactiques) dont la toxicité est connue, mais pour lequel l'effet tampon de la viande doit minimi-

ser l'action antagoniste lors de la conservation de la viande fraîche; le peroxyde d'hydrogène et l'hypothiocyanate qui pourraient bien être des armes redoutables produites par *L. sakei*.

CONCLUSION

L'analyse du génome de *L. sakei* nous a permis de cerner plusieurs caractéristiques qui permettent de comprendre pourquoi cette bactérie s'implante, se développe et survit sur la viande, et donne des pistes pour comprendre comment elle peut supplanter d'autres espèces bactériennes. Elle nous a aussi permis de pointer des paramètres physico-chimiques de la viande et de sa conservation sur lesquels agir pour favoriser ou non l'implantation de *L. sakei*. Ces hypothèses ne concernent qu'une seule souche, mais elles permettent de comprendre certains résultats expérimentaux, parfois anciens. Bien que plusieurs étapes doivent encore être franchies avant d'en arriver à l'utilisation de *L. sakei* comme agent bioconservateur de la viande, nous pensons avoir tous les éléments pour réussir. En effet, nous avons identifié d'une part les fonctions à privilégier pour sélectionner les souches les plus concurrentielles, et d'autre part les paramètres de conservation à utiliser pour favoriser leur implantation. Enfin, la connaissance du génome va amener au développement de nouvelles méthodes (comme l'utilisation des puces à ADN) qui vont permettre de suivre le comportement des souches in situ, ce qui était encore impossible hier.

B I B L I O G R A P H I E

BREDHOLT S., NESBAKKEN T., HOLCK A. (2001). Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 191-196.

CHAILLOU S., CHAMPOMIER-VERGÈS M., 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 Biotechnol.*, 23, 1527-1533.

CHAMPOMIER M.-C., MONTEL M.-C., GRIMONT F., GRIMONT P.A.D. (1987). Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sakei*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138, 751-758.

CHAMPOMIER-VERGÈS M.-C., CHAILLOU S., CORNET M., ZAGOREC M. (2002). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Res. Microbiol.* 153, 115-123.

DAL BELLO F., WALTER J., HAMMES W.P., HERTEL C. (2003). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in Human feces revealed by alternative incubation condition. *Microbiol. Ecol.* 45, 455-463.

DEVLEIGHÈRE F., VERMEIREN L., DEBEVERE J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14, 273-285.

EIJSINK V.G.H., AXELSSON L. (2005). Bacterial lessons in sausage making. *Nature Biotechnol.* 23, 1494-1495.

HAMMES W.P., BANTLEON A., MIN S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation, *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 165-174.

HAMMES W.P., HERTEL C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49, S125-S137.

KATAGIRI H., KITAHARA K., FUKAMI K. (1934). The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mash for sake manufacture. IV Classification of the lactic acid bacteria. *Bull. Agr. Chem. Soc. Jpn.* 10, 156-157.

TRÜPPER H.G., DE CLARI L. (1997). Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantive (nouns) in apposition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 908-909.

VERMEIREN L., DEVLEIGHÈRE F., DEBEVERE J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 149-164.

VOLD L., HOLCK A., WASTESON Y., NISSEN H. (2000). High levels background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157H7 in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 219-225.