HAL
open science

Les impacts de la réduction de la teneur en sel sur la conservation et les écosystèmes bactériens des chipolatas

Lysiane Fougy

To cite this version:

Lysiane Fougy. Les impacts de la réduction de la teneur en sel sur la conservation et les écosystèmes bactériens des chipolatas. Alimentation et Nutrition. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLA039 . tel-02104865

HAL Id: tel-02104865

https://theses.hal.science/tel-02104865v1

Submitted on 19 Apr 2019

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.

NNT : 2016SACLA039

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT (AGROPARISTECH)

ECOLE DOCTORALE N° 581
ABIES : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Par

Mme Lysiane Fougy

Les impacts de la réduction de la teneur en sel sur la conservation et les écosystèmes bactériens des chipolatas

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 15 décembre 2016

Composition du Jury :

Mme Bringel Françoise	Directrice de recherche CNRS, Strasbourg	Présidente
M. Chassard Christophe	Directeur de recherche, INRA, Aurillac	Rapporteur
M. Leroy Frédéric	Professeur, IMDO, Vrije Universiteit Brussel	Rapporteur
Mme Zagorec Monique	Directrice de recherche, INRA, Nantes	Examinatrice
M. Chaillou Stéphane	Chargé de recherche, INRA, Jouy en Josas	Directeur de thèse
Mme Champomier Vergès Marie-Christine	Directrice de recherche, INRA, Jouy en Josas	Co-encadrante de thèse
Mme Desmonts Marie-Hélène	Chef de projets, Aérial, Illkirch	Co-encadrante de thèse

Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, c'est parce que nous n'osons pas que les choses sont difficiles – Sénèque

REMERCIEMENTS

Me voilà donc au terme de cette thèse, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier Alain Strasser, pour l'accueil au sein d'Aérial et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie Stéphane Chaillou pour son encadrement durant ces trois années de thèse, pour ses conseils et sa rigueur scientifique qui m'ont été d'une aide précieuse dans l'avancement de ce travail de recherche.

Je remercie également Marie-Hélène Desmonts d'avoir co-encadré ce travail de thèse. Son investissement, ses conseils et sa disponibilité ont également contribué à la bonne réussite de ce projet.

Je remercie Marie-Christine Champomier Vergès pour son accueil au sein de l'équipe FME. Je la remercie également pour son soutien et ses nombreux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je tiens à remercier Monsieur Christophe Chassard et Monsieur Frédéric Leroy d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de recherche. Je remercie également Madame Françoise Bringel et Madame Monique Zagorec qui ont accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Monsieur Pierre Colin et Monsieur Mickaël Desvaux, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que pour leurs conseils et leurs remarques constructives.

Je remercie également Madame Sylvie Dumoulin et Madame Françoise Marcon pour les conseils techniques qu'elles ont pu m'apporter.

J'adresse mes sincères remerciements à Gwendoline. Merci pour l'aide inconditionnelle tout au long de ces trois années, pour les réponses à toutes mes questions, pour les relectures, pour toutes les discussions (scientifiques et les autres) que nous avons pu avoir. Je te souhaite plein de bonnes choses avec ta petite puce.

Je remercie sincèrement Christine pour son aide technique, ses conseils pratiques. Je remercie aussi Bernard pour sa bonne humeur, son optimisme permanent et ses conseils antistress. Je les remercie pour leur soutien dans les moments de doutes et les périodes difficiles. Finalement, vous n'en avez pas fini avec moi !

Je tiens également à remercier Erwann pour le suivi de ce projet de thèse, pour ses précieux conseils et surtout pour sa participation aux analyses sensorielles des chipolatas altérées à 9 h du matin. Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel d'Aérial : Adeline, Adrienne, Anthony, Benoit, Dalal, Edwige, Eric, Florent, Marie-Pierre, Paul, Rémy, Sébastien, Sophie, Valérie et Véronique qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre durant ces trois années. Je souhaite remercier Julie et Rachel pour les bons moments que nous avons pu passer, pour les échanges sur le doctorat et pour les conseils que vous m'avez apportés.

Je remercie également les membres actuels et anciens de l'équipe FME que j'ai pu côtoyer, Monique et Jamila ; les membres de l'équipe COMBAC et plus particulièrement Mylène, Coralie, Vincent, Rozenn ; les membres de la plateforme PAPSSO et ceux de l'équipe BIMLIP. Je les remercie pour leur accueil au 526, pour les chaleureuses pauses-cafés (c'est important) et pour leur sympathie. Je leur souhaite bonne continuation dans leurs projets respectifs.

Je souhaite également remercier trois compères de thèse, Amélie, Aline et Lucas, pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir, mais aussi pour les échanges de galères de doctorants. Poulet, cholestérol et fermentation : bonne continuation à tous les trois !

Un grand merci à tous mes amis, de l'ESIX et d'ailleurs et particulièrement à Anne-Laure, pour sa présence, son soutien, sa disponibilité et surtout pour son amitié sans faille. C'est bon, maintenant je suis disponible pour venir à Lille !

Je tiens à remercier tout particulièrement ma maman, Laurence, de m'avoir encouragée et soutenue dans tous mes choix tant professionnels que personnels. Je souhaite également adresser mes remerciements les plus sincères à mes frères et sœurs, Florian, Florine, Marie, Alexandre, Nathan, Zoé et Simon. Je les remercie pour leur soutien permanent dans les moments difficiles, mais surtout leur présence dans les moments de joie. Ils ont toujours su trouver les mots ou les moyens pour m'encourager et me soutenir tout au long de cette thèse. Je ne vais pas m'étendre ici, mais ils savent la valeur qu'ils ont à mes yeux. J'ai également une pensée pour Alain et Nicole.

Last but not least, c'est à Matthieu que j'adresse mes derniers remerciements. Merci pour le soutien et les encouragements pendant ces trois années et surtout durant les derniers mois de rédaction. Merci de m'avoir écoutée des heures durant parler de mes petites bactéries et de mes soucis en bioinformatique. Merci de ta présence quotidienne, et en route maintenant !

Merci vielmol

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANSES	Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATR	Acid Tolerance Response
BHI	milieu Brain Heart Infusion
DEFT	Direct Epifluorescent Filter Technic
DGGE	Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority)
EPT	Eau Peptonnée Tamponée
FICT	Fédération Française des Industriels Charcutiers Traiteurs
FISH	Hybridation *in situ* en fluorescence (Fluoresence *In Situ* Hybridation)
FM	Facteur Multiplicatif
INCA	Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires
MAP	Sous atmosphère modifiée (Modified Atmosphere Packaging)
MRS	Milieu de Man, Rogosa et Sharpe
MID	Multiplex IDentifier
m/m	Masse/masse
m/v	Masse/volume
OTU	Operational Taxonomic Unit
PA/PE	Polyamide et Polyéthylène
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
RNAseq	RNAsequencing
SPI	Ilots de pathogénicité de *Salmonella* (*Salmonella* Pathogenecity Island)
tec	Tonnes equivalent carcasses
TIA	Toxi-Infection Alimentaire
TSA	Milieu Tryptone Soy Agar
UFC	Unité Formant Colonie
VPA	Sous vide (Vacuum Packaging)
WHO	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : contributions des produits alimentaires à l'apport sodé en France 8

Figure 2 : origines microbiennes des TIA en Europe en 2013 34

Figure 3 : les différentes approches à haut-débit utilisées pour décrire et caractériser les communautés microbiennes 46

Figure 4 : représentation du gène codant pour l'ARNr 16S présentant les 9 régions hypervariables 48

Figure 5 : plan expérimental à 4 conditions pour l'analyse de l'altération 65

Figure 6 : espace couleur L*a*b* 69

Figure 7 : configuration PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S 81

Figure 8 : représentation schématique des réactions enzymatiques ayant lieu lors du pyroséquençage 82

Figure 9 : séquençage des fragments d'ADNc par la technologie HiSeq 2000/2500 85

Figure 10 : format FASTQ des données de séquençage 86

Figure 11 : score de qualité des nucléotides en fonction de leur position sur la séquence 87

Figure 12 : représentation schématique de la table d'abondance brute T1 des 470 références génomiques de la base DB7 94

Figure 13 : représentation schématique de la table d'abondance brute T2 des 112 références génomiques de la base DBPVS 95

Figure 14 : représentation schématique d'un gène orthologue 96

Figure 15 : extrait d'un catalogue de gènes au format gff3 98

Figure 16 : représentation schématique des tables d'abondance des gènes exprimés en fonction des échantillons 99

Figure 17 : calcul de l'abondance moyenne (moyenne géométrique) de chaque gène 100

Figure 18 : calcul du facteur de normalisation 101

Figure 19 : multiplication de chaque comptage par le facteur de normalisation 101

Figure 20 : représentation schématique de la stratégie expérimentale mise en œuvre pour l'analyse de l'altération et de la communauté bactérienne des chipolatas 104

Figure 21 : stratégie d'analyse des données de RNAseq 129

Figure 22 : nombre de génomes bactériens de référence contenu dans les différentes bases de données pour l'alignement des séquences d'ARN et comparaison avec le nombre d'OTU identifiés par pyroséquençage 132

Figure 23 : abondance relative des différents transcriptomes 135

Figure 24 : classification hiérarchique des métatranscriptomes..... 138

Figure 25 : classification fonctionnelle des gènes exprimés du métagénome après 21 jours de conservation 140

Figure 26 : dispersion de l'expression différentielle des gènes du métatranscriptome (A), des clusters de gènes orthologues de *L. sakei* (B) et des clusters de gènes orthologues de *Serratia* (C)..... 144

Figure 27 : voie de la synthèse d'acides gras chez *L. sakei* 146

Figure 28 : principales voies métaboliques de *Serratia* dont l'expression des gènes est modulée par la teneur en sel dans les chipolatas 158

Figure 29 : dynamique de croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata préalablement décontaminée 172

Figure 30 : comparaison de la qualité des ARN extraits à partir de la mêlée de chipolata (A) et à partir de culture pure (B) 174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : activité de l'eau des denrées alimentaires et inhibition des micro-organismes..... 6

Tableau 2 : réglementation européenne applicable à la réduction de la teneur en sel dans les produits alimentaires 10

Tableau 3 : espèces répertoriées comme potentiellement altérantes dans les produits carnés. 20

Tableau 4 : limites et optimum de croissance de *Salmonella* spp. sous différents paramètres 37

Tableau 5 : milieux de culture et conditions d'incubation pour la numération des bactéries viables..... 71

Tableau 6 : équations mathématiques utilisées pour la quantification des bactéries dans les chipolatas à partir des valeurs Ct..... 80

Tableau 7 : description des amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S autour de la région V1-V3 83

Tableau 8 : données de séquençage et d'alignement des séquences des 16 échantillons contre les génomes bactériens de référence 131

Tableau 9 : gènes de *L. sakei* impliqués dans la biosynthèse des acides gras, différentiellement exprimés selon la teneur en sel..... 147

Tableau 10 : gènes de *Serratia* spp. impliqués dans la biosynthèse des acides gras, différentiellement exprimés selon la teneur en sel 149

Tableau 11 : gènes du métagénome impliqués dans la biosynthèse des acides gras, différentiellement exprimés selon la teneur en sel 150

Tableau 12 : gènes de *Serratia* spp. impliqués dans la biosynthèse des acides aminés..... 152

Tableau 13 : clusters de gènes orthologues de *L. sakei* sur-exprimés dans les chipolatas à teneur réduite en sel..... 153

Tableau 14 : clusters de gènes orthologues de *Serratia* spp. sur-exprimés dans les chipolatas à teneur réduite en sel..... 156

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

1. Publication dans une revue internationale à comité de lecture

L. Fougy, **MH. Desmonts**, **G. Coeuret**, **C. Fassel**, **E. Hamon**, **B. Hézard**, **MC. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. 2016. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity. Applied and Environmental Microbiology, **82**:3928-3939.

2. Communications orales

1) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **G. Coeuret**, **C. Fassel**, **E. Hamon**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Study of spoilage phenomenon and *Salmonella* development in fresh pork sausages. Colloque des jeunes chercheurs, 3 décembre 2014, Jouy-en-Josas, France.

2) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **G. Coeuret**, **C. Fassel**, **E. Hamon**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Salt and storage packaging: modifying factors of spoilage microbial diversity in raw pork sausages. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, 9 avril 2015, Strasbourg, France.

3) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **G. Coeuret**, **C. Fassel**, **E. Hamon**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Changes in the nature and the dynamic of spoilage microbial ecosystems in raw pork sausages by two abiotic factors: salt and packaging conditions. Journées des Doctorants de l'unité Micalis, 29 avril 2015, Jouy-en-Josas, France.

4) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **G. Coeuret**, **C. Fassel**, **E. Hamon**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Investigating the spoilage microbial diversity in raw pork sausages: role of salt and packaging storage conditions. Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 17-19 juin 2015, Lille, France.

5) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **C. Fassel**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Faible impact de la réduction de NaCl sur la croissance de *Salmonella* dans les chipolatas. Congrès National de la Société Française de Microbiologie, 22-23 mars 2016, Paris, France.

6) Participation au concours « Ma thèse en 180 secondes ». Université Paris-Saclay, Paris, France

3. Communications affichées

1) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **G. Coeuret**, **C. Fassel**, **E. Hamon**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Influence of salt and storage packaging conditions on the spoilage microbial diversity of raw pork sausages. International Conference on Microbial Diversity, 27th -29th October 2015, Perugia, Italia.

2) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **C. Fassel**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier-Vergès**, **S. Chaillou**. Low NaCl reduction impact on *Salmonella* growth in pork sausages. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, 3 mars 2016

3) L. Fougy, **M.-H. Desmonts**, **C. Fassel**, **B. Hézard**, **M.-C. Champomier Vergès**, **S. Chaillou**. Low NaCl reduction impact on *Salmonella* growth in pork sausages. International Symposium Salmonella and Salmonellosis, 6th-8th June 2016, Saint-Malo, France.

AVANT-PROPOS

Dans ce manuscrit, les termes anglais utilisés couramment dans le champ thématique de l'étude seront utilisés. Pour les termes peu connus, la traduction française est apportée.

La dénomination complète (genre et espèce) des espèces bactériennes est indiquée dès la première citation, les autres citations sont indiquées en format abrégé : l'intiale du genre puis le nom de l'espèce.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION 1

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4

2.1. Le sel et les produits de charcuterie 4

2.1.1. L'importance économique de l'industrie des produits de charcuterie 4

2.1.2. L'utilisation du sel dans les produits de charcuterie 4

2.1.3. Les recommandations de réduction de la teneur en sel dans les produits de charcuterie ..9

2.2. Communautés microbiennes des produits carnés 12

2.2.1. La viande : un substrat propice au développement microbien 12

2.2.2. Contaminations microbiennes dans les premières étapes de transformation de la viande12

2.2.3. Les bactéries d'altération des produits carnés 17

2.2.4. La présence accidentelle de bactéries pathogènes de la viande : le cas de *Salmonella enterica* 33

2.3. L'écologie microbienne des aliments 42

2.3.1. Notions d'écologie microbienne 42

2.3.2. La structure d'une communauté microbienne 42

2.3.3. Les méthodes de caractérisation des communautés microbiennes 44

2.3.4. L'utilisation de la métagénomique pour caractériser la diversité des communautés bactériennes des aliments 47

2.3.5. L'utilisation de la métatranscriptomique pour mettre en évidence les informations fonctionnelles portées par la communauté bactérienne des aliments 54

3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS D'ÉTUDE 58

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES 60

4.1. Préparation des chipolatas et du matériel biologique 60

4.1.1. Chipolatas de porc 60

4.1.2. Souche et inoculation de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata 63

4.1.3. Plans expérimentaux 65

4.2. Analyses sensorielles, physico-chimiques et microbiologiques 68

4.2.1. Caractérisation sensorielle de l'altération des chipolatas 68

4.2.2. Mesures physico-chimiques 69

4.2.3. Numérations microbiologiques sur milieux de culture solides 70

4.3. Techniques de biologie moléculaire 72

4.3.1. Extraction des bactéries à partir des chipolatas 72
4.3.2. Extraction et contrôle des acides nucléiques 72
4.3.3. Amplification des acides nucléiques par réaction de polymérisation en chaîne 77
4.3.4. Techniques de séquençage à haut débit 80
4.4. Analyses bio-informatiques et bio-statistiques 86
4.4.1. Format des données de séquençage 86
4.4.2. Traitement et analyses de données métagénétiques d'amplicons 16S 87
4.4.3. Pipeline d'analyse des données de RNAseq 92

5. RÉSULTATS 104
5.1. Stratégie expérimentale pour évaluer les impacts de la réduction de sel sur la communauté bactérienne des chipolatas associée à l'altération 104
5.2. La réduction de sel dans les chipolatas augmente l'altération tout en réduisant la diversité bactérienne 107
5.2.1. Hypothèses et objectifs 107
5.2.2. Méthodologie 107
5.2.3. Principaux résultats 107
5.2.4. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity 109
5.2.5. Conclusion et perspectives 127
5.3. La réduction de la teneur en sel impacte les activités métaboliques des espèces sous-dominantes de la communauté bactérienne des chipolatas 128
5.3.1. Hypothèses et objectifs 128
5.3.2. Démarche expérimentale 128
5.3.3. Stratégie d'analyse des données RNAseq et résultats de séquençage 129
5.3.4. Les transcriptomes de *Lactobacillus sakei* et de *Serratia* spp. représentent les activités transcriptionnelles majoritaires 134
5.3.5. Après 21 jours de conservation, la communauté bactérienne des chipolatas est toujours très active métaboliquement 139
5.3.6. Réponses transcriptionnelles de la communauté bactérienne à la réduction de la teneur en sel dans les chipolatas 141
5.3.7. Discussion 159
5.4. La réduction de la teneur en sel impacte faiblement la croissance de S*almonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata 169
5.4.1. Stratégie expérimentale 169
5.4.2. La croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium est affectée par le type de conditionnement et dans une moindre mesure par la teneur en sel 171
5.4.3. Extraction des ARN de *Salmonella* ser. Typhimurium 173
5.4.4. Discussion 175

6. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 179

7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 192

8. ANNEXES 213

8.1. Pipeline d'analyse des données de séquençage 16S 213

8.2. Pipeline d'analyse des données de RNAseq 216

8.3. Liste des références génomiques de la DB7 224

8.4. Liste des références génomiques de la DBPVS 228

8.5. Gènes du métagénome impliqués dans les processus cellulaires et sous-exprimés quand la teneur en sel est réduite 229

8.6. Voie de synthèse des acides gras chez *Serratia* spp. 234

8.7. Voie de synthèse de la tyrosine et de la phénylalanine chez *Serratia* spp. 235

8.8. Voie de synthèse de la valine chez *Serratia* spp. 236

8.9. Voie de synthèse de la lysine chez *Serratia* spp. 237

8.10. Voie de synthèse de l'arginine et de l'ornithine chez *Serratia* spp. 238

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le sel est le plus ancien conservateur alimentaire utilisé pour conserver les denrées alimentaires et notamment les produits carnés. Depuis 2002, les autorités sanitaires font état d'une consommation excessive de sel (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, AFSSA, 2002). En France, la consommation quotidienne moyenne de sel est de 8,7 g pour les hommes et 6,7 g pour les femmes, sans compter les 1 à 2 g provenant du sel ajouté lors de la consommation des produits. Ces apports sont excessifs puisque l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande un apport quotidien inférieur à 5 g. Les risques associés à une surconsommation de sel sont bien connus (hypertension artérielle, maladies cardiovasculaires, ostéoporose). La réduction de la consommation en sel est un enjeu majeur de santé publique et cette réduction peut être en partie attribuable à la diminution des teneurs en sel dans les aliments. Parmi les aliments fortement contributeurs à ces apports, les produits de charcuterie sont en deuxième position (15 % des apports sodés) après le secteur de la panification et des biscottes (31 % des apports sodés). Dans les produits de charcuterie, le sel est utilisé pour ses propriétés organoleptiques et technologiques (amélioration de la couleur et de la saveur des produits, augmentation de la rétention d'eau) ainsi que pour ses propriétés bactériostatiques [diminution de l'aw (activité de l'eau) et inhibition du développement microbien].

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur les **impacts de la réduction de la teneur en sel sur la conservation des produits de charcuterie.** Ne pouvant prétendre à une étude exhaustive des produits de charcuterie, nous avons porté notre étude sur les chipolatas de porc. Pour apporter des réponses à cet objectif général, nous avons abordé deux aspects de la conservation : la conservation d'un point de vue de la qualité organoleptique et la conservation des produits d'un point de vue de la qualité sanitaire. Pour le premier aspect, nous avons étudié les conséquences de la réduction de la teneur en sel sur l'altération des chipolatas en lien avec la diversité et les activités métaboliques bactériennes. Pour le

deuxième aspect, nous avons focalisé notre attention sur *Salmonella* ser. Typhimurium, le premier agent bactérien pathogène impliqué dans les Toxi-Infections Alimentaires (TIA) et fréquemment isolé de viande de porc. C'est ainsi que nous avons construit nos travaux de recherche présentés dans ce manuscrit comportant six chapitres principaux.

Après ce premier chapitre introductif, nous avons recensé dans le deuxième chapitre à travers la revue bibliographique, les connaissances actuelles et les données nécessaires à la réalisation de ce travail. La première partie replace l'importance du sel dans les produits de charcuterie et expose le contexte des recommandations nutritionnelles. La deuxième partie est consacrée à la description des connaissances actuelles sur les communautés bactériennes des produits carnés et sur les agents bactériens impliqués dans l'altération de ces produits. La troisième partie présente l'évolution des techniques utilisées pour caractériser la diversité et les activités métaboliques d'une communauté bactérienne.

Ensuite, le troisième chapitre présente de manière plus exhaustive les hypothèses et les objectifs de ce travail.

Le quatrième chapitre décrit l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés pour répondre à notre problématique.

Les résultats et les discussions de ces travaux sont présentés dans le cinquième chapitre. La première partie présente les résultats de caractérisation de l'altération et de la diversité bactérienne des chipolatas sous l'effet de la réduction de la teneur en sel. La deuxième partie présente les analyses transcriptionnelles qui traduisent les activités métaboliques de la communauté bactérienne des chipolatas altérées. La troisième partie porte sur les résultats de croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans les chipolatas.

Enfin, dans un sixième chapitre, nous proposerons une discussion générale qui synthétise l'apport de ces travaux pour une meilleure connaissance des interactions entre la communauté bactérienne et l'environnement dans lequel elle se trouve.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE entre le Centre de Ressources Technologiques Aérial (Illkirch-Graffenstaden) et l'équipe FME (Food Microbial Ecology), UMR1319, Institut Micalis (INRA Jouy en Josas). Il a été réalisé grâce aux supports financiers de l'Agence Nationale de la Recherche et Technologie (ANRT), de la Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt (DRAAF) de la région Alsace, actuellement Région Grand Est et de l'Unité Micalis (département MICA, INRA).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Le sel et les produits de charcuterie

2.1.1. L'importance économique de l'industrie des produits de charcuterie

L'industrie des produits carnés représente, en chiffre d'affaires, le premier secteur des industries agro-alimentaires en France (20,5 % du chiffre d'affaires global en 2012) devant l'industrie laitière (19,2 %). La viande de porc, y compris sous forme transformée est la viande la plus consommée en France (32,5 kg/hab/an en 2014) devant la viande de volaille (26,3 kg/hab/an) et la viande bovine (24,2 kg/hab/an) (FranceAgriMer, 2015).

En 2015, 23,1 millions de porcs ont été élevés et abattus en France. Cette production représente 2,2 millions de tec (tonnes équivalent carcasses) de viande de porc et place la France au troisième rang de l'Union Européenne, derrière l'Allemagne (5,03 millions de tec en 2015) et l'Espagne (3,9 millions de tec en 2015). La moitié de la production de viande de porc est transformée en produits de charcuterie regroupant une large gamme de produits répartis entre les charcuteries salaisons (85 % de la production totale), les produits traiteurs et les conserves de viande. Parmi les charcuteries et salaisons, caractérisées par l'utilisation de sel (en salage ou en saumure), le jambon cuit ainsi que les saucisses à cuire (dont les chipolatas) sont les plus fabriqués, 260 247 tonnes (22 % de la production de charcuterie) et 185 223 tonnes (16 %) respectivement en 2015 (FICT 2016).

2.1.2. L'utilisation du sel dans les produits de charcuterie

Le sel alimentaire, présent à l'état naturel, est principalement composé de chlorure de sodium NaCl [40 %, équivalent masse, de Na (sodium) et 60 %, équivalent masse, de Cl (chlore)]. Le sel peut provenir de marais salants, de gisements souterrains de sel de gemme ou encore de saumure naturelle ou provoquée par l'homme (solution de chlorure de sodium dans

l'eau, à une concentration supérieure à celle de l'eau de mer qui est d'environ 3,5 % de NaCl, m/m). Selon la norme adoptée en 1985 par le *Codex Alimentarius*, la teneur en NaCl dans le sel alimentaire doit être supérieure à 97 % d'extrait sec en masse (Codex Alimentarius 1985).

2.1.2.1. Les propriétés technologiques et bactériostatiques du sel dans les produits de charcuterie

Le sel, NaCl, est l'ingrédient principal des produits de charcuterie et ses propriétés sont multiples. D'un point de vue technologique, le NaCl favorise la solubilisation des protéines des fibres musculaires, dont les protéines myofibrillaires très présentes dans la viande. Cette solubilisation des protéines engendre la formation d'un enduit à la surface de la viande qui gélifie à la suite d'un traitement thermique et permet d'améliorer la tenue et l'aptitude au tranchage des produits cuits (Bombrun *et al.*, 2015). L'ajout de sel dans les produits de charcuterie permet également d'augmenter la capacité de rétention d'eau (eau propre ou eau ajoutée lors de certaines préparations) des protéines myofibrillaires. Cette rétention d'eau permet de réduire les pertes à la cuisson et ainsi d'augmenter les rendements de fabrication, la tendreté et la jutosité des viandes. À titre d'exemple, Ruusunen (2001) a rapporté que l'ajout de 2,6 % (m/m) de sel dans du jambon cuit entraînait 3,8 % de perte de masse à la cuisson contre 5,5 % de perte avec 1,1 % (m/m) de sel.

En plus de cette propriété structurante pour les produits, le sel est un élément essentiel à la qualité organoleptique des produits de charcuterie : seul le chlorure de sodium est associé au goût salé et intensifie la saveur globale de l'aliment. Il permet également le masquage de certains goûts métalliques, amers ou de flaveurs chimiques (Keast et Breslin 2003 ; Liem *et al.*, 2011). Enfin, le sel influence également le développement de la couleur dans des produits à longue maturation comme certains jambons secs (jambon de Parme) en favorisant les activités enzymatiques permettant la formation du pigment caractéristique à partir de la myoglobine (Wakamatsu *et al.*, 2004).

Outre les aspects technologiques et organoleptiques, l'utilisation de sel est le plus ancien procédé de conservation des produits alimentaires et notamment des produits carnés hautement périssables. L'activité bactériostatique du sel se rapporte essentiellement à son effet sur la réduction de l'activité de l'eau (a_w), terme introduit par Lewis et Randall (1923), qui mesure la disponibilité de l'eau pour les réactions biologiques. Cette valeur d'a_w varie entre 0 (produit « sec » au point que toute l'eau présente est liée à l'aliment) et 1 (eau pure et sans soluté). Par exemple, la valeur d'a_w de la viande fraîche est supérieure à 0,99 et celle du saucisson sec (produit de salaison) est comprise entre 0,85 et 0,90. L'ajout de sel contribue à réduire l'a_w des produits alimentaires et ainsi à limiter le développement des micro-organismes (Tableau 1).

Tableau 1 : activité de l'eau des denrées alimentaires et inhibition des micro-organismes (source : Fontana, 2011)

Gamme d'a_w	**Exemple d'aliments se trouvant dans cette gamme d'a_w**	**Micro-organismes inhibés par la plus petite valeur d'a_w de la gamme**
1,00-0,95	Viandes et poissons frais, fruits, légumes, lait, produits de charcuterie ; produits alimentaires contenant jusqu'à 7 % (m/m) de sel	*Pseudomonas, Escherichia, Proteus, Shigella, Klebsiella, Bacillus, Clostridium* Quelques levures
0,95-0,91	Certains fromages (cheddar, munster, provolone), jambon cru, viandes fumées ; produits alimentaires contenant jusqu'à 12 % (m/m) de sel	*Salmonella, Vibrio Clostridium, Serratia, Lactobacillus, Pediococcus* Certaines moisissures Quelques levures : *Rhodotorula, Pichia*
0,91-0,87	Saucissons secs, fromages secs, flancs, margarine ; produits alimentaires contenant jusqu'à 15 % (m/m) de sel	*Micrococcus* *Candida, Torulopsis, Hansenula*
0,87-0,80	La plupart des jus de fruits concentrés, légumes secs, lait concentré sucré, sirops d'érable et de fruits, farines, riz et légumes secs	*Staphylococcus* La plupart des moisissures : *Penicillia* La plupart des *Saccharomyces* et *Debaryomyces*.
0,80-0,750	Confitures, marmelades, gelées de fruits, pâte d'amande, fruits confits	Bactéries halophiles : *Halobacterium salinarum, Halococcus* spp.
0,75-0,65	Gelées alimentaires, sucre brut,	Moisissures xérophiles : *Aspergillus,*

	flocons d'avoine, nougats, certains fruits secs, noix	*Wallemia* *Saccharomyces*
0,65-0,60	Caramels, bonbons, fruits secs, miel	*Aspergillus*, *Manoscus* Levures osmophiles : *Saccharomyces*
0,60-0,50	Pâtes alimentaires, épices	Pas de prolifération microbienne
0,50-0,40	Œufs en poudre	Pas de prolifération microbienne
0,40-0,30	Biscuits secs, croûte de pain	Pas de prolifération microbienne
0,30-0,20	Laits en poudre, légumes déshydratés	Pas de prolifération microbienne

Selon la teneur en eau disponible dans le produit, ce ne sont pas les mêmes types de micro-organismes qui vont être capables de se développer puisque chacun d'eux a des tolérances différentes au niveau d'a_w. L'ajout de 7 % de NaCl (m/m) dans les produits alimentaires permet de réduire leur a_w jusqu'à 0,95 (Tableau 1) ; tandis que l'ajout de 15 % de NaCl (m/m) permet d'obtenir des a_w de l'ordre 0,87. À ce niveau d'a_w, la croissance de la plupart des bactéries est inhibée. De plus, l'ajout de sel dans les produits alimentaires entraine un rapide flux d'eau vers l'extérieur de la cellule bactérienne, qui a pour conséquence une diminution de la pression de turgescence, une variation de la concentration cytoplasmique en solutés et un changement de volume cellulaire, provoquant ainsi la mort cellulaire ou un retard de croissance (Davidson, 2001).

2.1.2.2. Contribution des produits de charcuterie aux apports sodés des Français

Usuellement, la dénomination « sel » est utilisée comme synonyme de « chlorure de sodium » et environ 90 % de la consommation de sodium est sous forme de chlorure de sodium. Les apports en sodium de la population française proviennent du sodium naturellement présent dans les aliments, du sel ajouté lors de la transformation des produits et du sel ajouté à la cuisson ou lors de la consommation. Il est estimé que 75 à 80 % du sel absorbé quotidiennement provient de la consommation de produits industriels transformés (Brown *et al*., 2009).

En France, le secteur des produits de charcuterie est le deuxième contributeur aux apports sodés (15 % des apports sodés - Figure 1) par l'alimentation après le secteur du pain et des biscottes (31 % des apports sodés) :

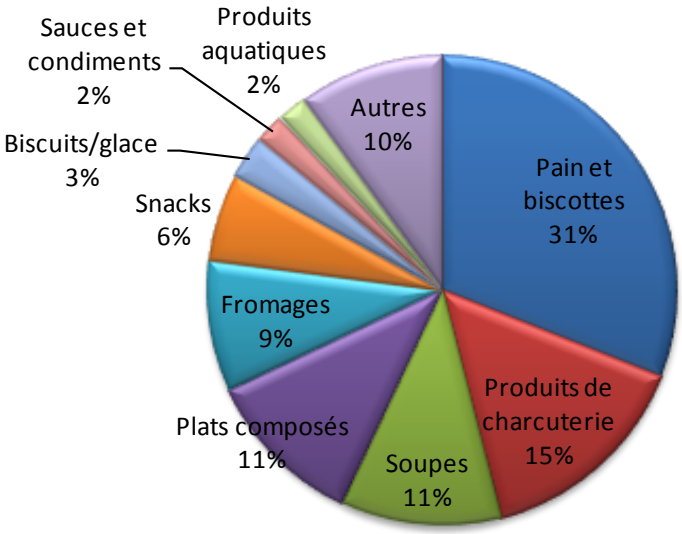


Figure 1 : contributions des produits alimentaires à l'apport sodé en France (source : Lafay, 2007 : INCA2, Étude Individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires 2006-2007)

2.1.2.3. La surconsommation de sel : excès et risques pour la santé

Les données des apports en sel, basées sur les études de consommation alimentaire, soulignent qu'en France la consommation moyenne mesurée de sel, pour les femmes est de 6,9 g/j (soit l'équivalent de 2 700 mg de sodium) et de 9,1 g/j (3 600 mg de sodium) pour les hommes et 20 % de la population est concernée par des consommations excessives de plus de 12 g/j de sel (Lafay, 2007). À ces apports, provenant des aliments consommés, il faut ajouter 1 à 2 g/j de sel, dus au salage des plats et de l'eau de cuisson par le consommateur lui-même. Bien que le sodium soit un nutriment nécessaire au maintien du volume plasmatique, à l'équilibre acido-basique, à la transmission des influx nerveux et au fonctionnement normal des cellules, il est difficile de mesurer les besoins réels en sodium. L'Agence Nationale de

Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) considère que ces besoins devraient être de 400 à 800 mg de sodium par jour, soit 1 à 2 g de sel par jour pour assurer l'homéostasie (Afssa, 2002). Ainsi, la consommation totale de sel des Français est bien supérieure aux recommandations de santé publique.

Dès le début des années 1900, les travaux de Ambard et Beaujard (1904) ont souligné pour la première fois la relation entre la consommation de sel et la pression artérielle des patients souffrant d'hypertension. Depuis, de nombreuses études scientifiques confirment la relation directe entre la consommation de sel et la pression artérielle (Sanders, 1996 ; Law, 2000 ; Ritz, 2010 ; Elijovich *et al*., 2016). De plus, les excès de sodium augmentent les pertes urinaires en calcium ce qui favorise l'ostéoporose (Cappuccio *et al*., 2000), engendrent des phénomènes d'obésité (Cocores et Gold, 2009) et augmentent le risque de cancer de l'estomac (Ngoan et Yoshimura, 2003).

Il y a donc nécessité à ce que les apports sodés quotidiens soient adaptés aux besoins de la population française. Les diminutions d'apports en sodium de la population sont en partie attribuables aux diminutions des teneurs en sel ajoutées lors de la transformation des produits et cette réduction devient une priorité pour les secteurs les plus contributeurs à ces apports et notamment le secteur des produits de charcuterie.

2.1.3. Les recommandations de réduction de la teneur en sel dans les produits de charcuterie

Les autorités sanitaires se sont saisies de cette problématique de santé publique liée à la surconsommation de sodium et dès 2002, l'AFSSA a proposé des recommandations afin de réduire de 20 %, à échéance de 5 ans, l'apport moyen de sel de l'ensemble de la population française, pour atteindre un apport moyen de 7 à 8 g/j de sel. Au niveau mondial, l'OMS a fixé en 2003 une recommandation de consommation maximale de sel à 5 g/j (Nishida *et al*.,

2004). La deuxième étude de consommation alimentaire menée en France entre 2006 et 2007 (Lafay, 2007) montre une baisse de 4,1 à 6,6 % d'apport moyen en sel, 6,6 g/j de sel pour les femmes et 8,6 g/j de sel pour les hommes : l'objectif de réduction de 20 % sur 5 ans n'est que partiellement atteint. Depuis, les États Membres de l'OMS ont décidé de réduire de 30 % la consommation de sel de la population mondiale d'ici 2025. De ces recommandations, le secteur des produits de charcuterie a mis en place une charte collective d'engagements de progrès nutritionnels qui a pour objectif de sensibiliser les acteurs de la filière à l'optimisation nutritionnelle des produits de charcuteries et plus particulièrement à l'amélioration des profils en sel et en gras. Ces recommandations ont été intégrées à la nouvelle version du Code des Usages de la Charcuterie (version 2016), guide de référence pour la fabrication des produits de charcuterie en France.

De plus, les diminutions des apports en sel par l'alimentation passent par la nécessité d'informer le consommateur sur la teneur en sel dans les produits alimentaires, et l'étiquetage nutritionnel, concernant la teneur en sodium, des produits alimentaires est réglementé (Tableau 2).

Tableau 2 : réglementation européenne applicable à la réduction de la teneur en sel dans les produits alimentaires

Etiquetage et appellation des produits	Teneur en sodium (équivalent en NaCl)
Réduit en sodium/sel	Diminution de la teneur en sodium de 25 % par rapport à la teneur moyenne des produits équivalents
Faible en sodium/sel	< 0,12 % (m/m) de sodium (0,30 % de NaCl, m/m)
Très faible en sodium/sel	< 0,04 % (m/m) de sodium (0,10 % de NaCl, m/m)
Sans sodium/sel	< 0,005 % (m/m) de sodium (0,013 % de NaCl, m/m)

Par ailleurs, en plus de cette réglementation, des seuils minimaux en sel sont fixés pour certains produits. C'est le cas notamment en France pour les chipolatas où la teneur

minimale en NaCl est de 1,5 % (m/m) pour revendiquer l'appellation chipolatas sur l'étiquetage (DGAL 2012).

La réduction de la teneur en sel suggère donc le développement de micro-organismes indésirables, micro-organismes altérants, où leur développement conduit à la dégradation organoleptique des produits, ou des micro-organismes pathogènes qui peuvent entrainer des TIA après ingestion de la viande contaminée.

2.2. Communautés microbiennes des produits carnés

2.2.1. La viande : un substrat propice au développement microbien

Après l'abattage de l'animal, le muscle est le siège de nombreux changements physico-chimiques qui vont modifier sa structure, sa composition et ses propriétés. Après la mort de l'animal, le pH proche de la neutralité, chute à 5,5/5,8 résultant de la dégradation dans les cellules musculaires du glycogène (polymère de glucose) en acide lactique par les enzymes du muscle. La composition chimique du muscle est très variable entre les différentes espèces, entre les races et chez un même animal, d'un muscle à l'autre. Lawrie (1991) rapporte une composition chimique moyenne du muscle, composée en majorité d'eau (75 % m/m). La matière sèche du muscle est constituée de protéines (19 % m/m) et contient peu de peptides et d'acides aminés (2,3 % m/m). La teneur en matière sèche est dépendante de la teneur en lipides, paramètre variable (de 2,3 à 8,7 % m/m) de la composition des muscles au détriment de la partie protéique. Enfin, à l'état brut, la viande contient peu de carbohydrates.

Pour leur croissance et le maintien des fonctions métaboliques, les micro-organismes ont besoin d'éléments nutritifs qui incluent l'eau (75 % d'eau dans la viande), une source d'énergie et d'azote (carbohydrates, protéines), de vitamines et de minéraux (fer). De ce fait, la viande est un substrat propice au développement microbien.

2.2.2. Contaminations microbiennes dans les premières étapes de transformation de la viande

Ante mortem, il est admis que les muscles des animaux sains sont encore stériles (Elmossalami et Wassf, 1971). Au cours de la transformation, la viande va être naturellement contaminée par des micro-organismes variés qui peuvent être de trois types : (1) des micro-organismes inoffensifs pour la santé des consommateurs et qui peuvent parfois être

bénéfiques pour le produit, (2) des micro-organismes altérants et (3) des micro-organismes pathogènes. Pour cette dernière catégorie, leur présence dans les produits carnés est accidentelle et fait l'objet d'une réglementation. Il faut tout de même noter que la frontière entre les différentes catégories n'est pas toujours bien délimitée. Ainsi, des espèces considérées comme inoffensives peuvent dans certaines conditions, voir selon les souches, être altérantes.

La charge initiale (taux de population microbienne dans la viande au jour de fabrication) de la viande est relativement faible. De nombreuses études (Jääskelainen *et al*., 2013 ; Chaillou *et al*., 2015 ; Nieminen *et al*., 2015 ; Zhao *et al*., 2015 ; Jääskeläinen *et al*., 2016) rapportent que cette charge se situe entre 10^3 et 10^5 UFC.g^{-1} (Unité Formant Colonie par gramme de viande). Les espèces retrouvées dans les produits carnés au jour de fabrication sont principalement des bactéries lactiques (Cocolin *et al*., 2004) et des Entérobactéries. Parmi les bactéries lactiques, Benson *et al*., (2014) ont mis en évidence la dominance d'espèces de la famille des *Leuconostocaceae* telles que *Weissella confusa* ou encore *Leuconostoc citreum.* Nowak *et al*., (2012) ont également montré la présence de *Brochothrix thermosphacta* dans de la viande de porc et il est bien admis que les *Pseudomonas* font aussi partie intégrante de la flore initialement présente dans les produits carnés (Ercolini *et al*., 2007). Dans ces produits, les levures et les moisissures peuvent également être présentes, mais à des taux bien inférieurs (< $2\log_{10}$UFC.g^{-1}, Nielsen *et al*., 2008) à ceux des bactéries. Dans la suite de cette étude, nous avons porté notre attention sur la présence des bactéries dans les produits carnés.

Les principales contaminations bactériennes en surface de la viande proviennent des étapes d'abattage. La première contamination de la viande bovine par la flore endogène a lieu lors de la dépouille de l'animal. À cette étape, le muscle peut entrer en contact avec le cuir et la peau de l'animal expliquant la présence de genres bactériens spécifiques de ces

environnements tels que *Corynebacterium* ou *Propionibacterium* dans les produits carnés (Chaillou *et al*., 2015). Ceci est en accord avec une autre étude qui a mis en évidence la présence des genres *Propionibacterium* et *Staphylococcus* dans de la viande de bœuf (De Filippis *et al*., 2013b). De plus, certaines zones des animaux sont plus sujettes à la contamination. Par exemple, Reid *et al*., (2002) ont recherché *Escherichia coli* O157 et *Salmonella* (prélèvement par application d'une éponge abrasive) sur le cuir de bovins abattus dans trois abattoirs de Grande-Bretagne sur trois zones différentes : l'arrière-train, les flancs et la pointe de poitrine. Les résultats de cette étude indiquent que la zone de la poitrine porte le plus souvent des agents pathogènes du tractus intestinal des animaux et qui sont impliqués dans des toxi-infections d'origine alimentaire (22,5 % de prévalence pour *E. coli* et 10,0 % de prévalence pour *Salmonella*). Lors de l'abattage des volailles, la contamination des carcasses par *Campylobacter* est diminuée après l'échaudage, mais la dissémination de la bactérie peut encore se produire, en particulier au cours des processus de plumaison, en raison de la capacité de ce pathogène à survivre dans l'eau (Figueroa *et al*., 2009). Les travaux de Fravalo *et al*., (2009) sont un exemple où il a été possible d'établir une relation linéaire entre la charge initiale de *Campylobacter jejuni*, première cause de gastro-entérites chez l'Homme en 2013 (EFSA 2015), sur la peau de volaille et la valeur du taux de transfert de cette bactérie vers la viande. Bien que les animaux soient contrôlés et nettoyés avant leur abattage, l'état de propreté de l'animal (présence de boues) est donc un facteur de risque quant à la présence de bactéries et notamment de bactéries pathogènes, sur leur peau.

L'éviscération est une étape critique où la contamination bactérienne des carcasses est la plus susceptible de se produire (Gill et Bryant, 1993 ; Yu et Palumbo, 2000). Le tractus gastro-intestinal des animaux est naturellement colonisé par des micro-organismes et les *Enterobacteriaceae* qui font partie de cet environnement peuvent être transférées à la carcasse (McEvoy *et al*., 2000). Une récente revue sur la présence d'*E. coli* et *d'Enterobacteriaceae* à

la surface des carcasses bovines met en évidence que les carcasses ayant subi une contamination fécale ont une charge bactérienne plus élevée que les carcasses non contaminées (Barco *et al*., 2015). Dans une autre étude sur les carcasses de porc, il a été montré qu'après éviscération le taux de population *d'Enterobacteriaceae* a significativement augmenté (de plus d'un log/cm² de surface) et notamment pour les échantillons prélevés au niveau des bajoues et de la poitrine (Wheatley *et al*., 2014). Cette étude souligne de nouveau les forts taux de contaminations bactériennes au niveau de la poitrine, aux abords de l'ouverture de l'éviscération.

Une autre source de contamination de la viande peut être l'environnement de l'abattoir et de l'usine de transformation de la viande. Hultman *et al*., (2015) ont récemment étudié la diversité bactérienne au long de la transformation, de la carcasse au produit fini (saucisses de porc cuites) en passant par l'environnement de transformation. Ainsi, les espèces du genre *Yersinia* étaient fortement abondantes sur les surfaces de travail (28 % de l'abondance totale), mais n'étaient retrouvés dans les produits finis que dans une moindre mesure (< 1% d'abondance). Parmi les espèces pathogènes, *Listeria monocytogenes* est fréquemment identifié comme contaminant d'origine environnementale et Gómez *et al*., (2015) révèlent que 22,7 % des surfaces de travail testées dans une usine de transformation de viande étaient positives à la présence de *L. monocytogenes*. Ce pathogène a la capacité de former des biofilms sur les surfaces de travail (Beresford *et al*., 2001) et les procédés de nettoyage et désinfection pour l'éliminer manquent d'efficacité. La présence de *Pseudomonas* au niveau des chaînes d'abattage et en particulier dans les chambres froides constitue une autre source de contamination environnementale connue (Labadie, 1999). Enfin, les étapes de transformation (découpe, hachage, conditionnement, etc.) sont aussi des sources de contamination par les micro-organismes.

Les ingrédients utilisés lors de la préparation des certains produits carnés transformés sont également une source potentielle de contamination bactérienne. Dans leurs récents travaux, Chaillou *et al*. (2015) ont comparé les communautés bactériennes de divers produits carnés et de produits de la mer en début de conservation et dans les produits altérés. Les dés de lardons (avec 3,1 % de NaCl) avaient une richesse bactérienne initiale supérieure (260 ± 45 OTU[1]) à celle des autres produits (189 ± 58 OTU). En outre, dans les produits frais, un grand nombre d'OTU (20 %) des dés de lardons était affilié à la communauté bactérienne spécifique des produits de la mer. La présence de ces OTU a été attribuée à la contamination par le sel utilisé lors du procédé de fabrication des lardons. Parmi les 6 espèces de *Lactobacillus* identifiées par Benson *et al*., (2014) dans les saucisses de porc, *Lactobacillus graminis* s'est révélée être l'espèce dominante dès 30 jours de conservation, et son origine a été attribuée au mélange d'épices utilisé dans la formulation. Pothakos *et al*., (2015) ont cherché à définir l'origine de la contamination en bactéries lactiques psychrotrophes dans des plats préparés. Pour ce faire, ils ont analysé les communautés bactériennes de toutes les matières premières utilisées (légumes, viandes/poissons, sauces, épices, etc.), des surfaces de travail, des équipements des lignes de production, de l'eau de nettoyage des lignes ainsi que des produits finis. Malgré le faible taux de population initiale en bactéries lactiques, *Leuconostoc gelidum* est le taxon le plus abondant en fin de vie des produits, représentant 18,6 à 81 % (selon les échantillons) de la communauté bactérienne des produits altérés. En analysant la prévalence de cette bactérie selon les différents points de prélèvement, les auteurs suggèrent que les ingrédients utilisés sont une source potentielle de contamination par *L. gelidum*. Enfin, Pisacane *et al*., (2015) ont pu mettre en évidence que le boyau naturel de porc utilisé dans la fabrication du salami traditionnel italien était une source majeure de contamination en *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus saprophyticus* ou encore *B. thermosphacta*.

[1] OTU : Operational Taxonomic Unit – Unité taxonomique opérationnelle : regroupement d'espèces à un seuil de plus de 97 % d'identité sur la base des séquences nucléiques du gène codant pour l'ARNr 16S.

Les exemples présentés soulignent que ce sont les conditions d'abattage (saignée, éviscération, etc.), de transformation (type et hygiène des procédés de transformation) et de stockage (conditionnement, température) qui vont conditionner l'évolution microbiologique des produits carnés et ainsi impacter la qualité sanitaire (présence de bactéries pathogènes) et/ou la durée de vie des produits (présence de bactéries altérantes).

2.2.3. Les bactéries d'altération des produits carnés

2.2.3.1. Définition de l'altération

L'altération d'un aliment est définie comme une modification indésirable et irréversible des propriétés physico-chimiques et organoleptiques du produit qui devient impropre à la consommation humaine. L'altération des viandes et des produits carnés[1] a principalement lieu lors de leur conservation et peut se manifester par une modification de la couleur, une production de poissage (enduit muqueux en surface) et une libération d'exsudat, une production d'odeurs et de saveurs désagréables et un gonflement des emballages de conservation par production de gaz (CO_2 — dioxyde de carbone et H_2S — hydrogène sulfuré). L'altération des produits carnés peut avoir une origine chimique naturelle (brunissement par oxydation des pigments de la viande, rancissement par oxydation des lipides) et/ou une origine microbienne. Cette dernière est la cause majeure de l'altération des produits carnés et est principalement attribuée à des bactéries.

2.2.3.2. Diversité des écosystèmes bactériens altérants

Comme il a été décrit précédemment, diverses espèces bactériennes sont initialement présentes dans les matières premières des produits carnés. Tout au long des étapes de conservation jusqu'à la fin de vie des produits, cette diversité d'espèces bactériennes évolue,

[1] Dans la suite du manuscrit, le terme « produits carnés » sera utilisé pour désigner la viande et les produits carnés transformés.

en nombre et en abondance (De Filippis *et al*., 2013b ; Benson *et al*., 2014 ; Chaillou *et al*., 2015 ; Hultman *et al*., 2015). Benson *et* al., (2014) ont montré une évolution successive de cette diversité bactérienne au cours du stockage. Au jour de fabrication, l'écosystème bactérien de saucisses de porc crues était dominé par des espèces appartenant à la classe des *Bacillus*, telles que *W. confusa* ou *L. citreum* (respectivement 50 et 20 % de la population totale). Dès 15 jours de conservation à 4 °C, ces deux espèces déclinent au profit de deux espèces de *Pseudomonas*, *Pseudomonas lini* et *Pseudomonas psychrophila* qui représentaient plus de 86 % de la population bactérienne. D'autres espèces, *Yersinia mollaretti*, *Serratia* spp. ou encore *Buttiauxella brennerae*, indétectables au jour de fabrication se sont développées au cours de la conservation, et sont devenues avec des flores lactiques (*L. graminis*, *Carnobacterium divergens*) les espèces dominantes après 30 jours de conservation à 4 °C au détriment des espèces de *Pseudomonas*. Cette évolution de population au cours du temps a conduit à une altération prononcée des saucisses à partir de 45 jours de conservation à 4 °C. Dans leurs travaux, Hultman *et al*., (2015) soulignent que le point clé qui favorise le développement d'espèces bactériennes altérantes dans les produits est la charge bactérienne initiale. Or, diverses études, et notamment celles de Benson *et al*., (2014) et Chaillou *et al*., (2015), mettent en évidence que les espèces bactériennes dominantes au jour de fabrication des produits ne sont pas nécessairement celles qui deviennent dominantes en fin de vie de conservation ou dans les produits altérés. Ces études soulignent également que ce n'est qu'une petite partie de la flore initialement présente qui est capable de se développer lors de la conservation. À ce titre, les études de De Filippis *et al*., (2013b), Chaillou *et al*., (2015), Stoops *et al*., (2015), mettent en évidence une évolution sélective de la diversité bactérienne. L'étude de la diversité bactérienne de dix produits carnés et produits de la mer entre le jour de fabrication et l'altération (phénomène identifié et caractérisé à des jours différents selon les produits) a mis en évidence une baisse significative de la diversité bactérienne au cours du stockage. Cette baisse de richesse était notamment flagrante pour les dés de lardons, produits

transformés, où en moyenne 260 OTU étaient détectables après fabrication (pour 10 échantillons indépendants analysés) et seulement 14 OTU ont été identifiées dans les produits altérés après 18 à 43 jours (selon les échantillons) de conservation à 8 °C sous atmosphère modifiée (Chaillou *et al*., 2015). De même, la diversité bactérienne de la viande hachée de bœuf, composée de 116 OTU le jour de fabrication, est drastiquement réduite à 15 OTU après 9 jours de conservation sous atmosphère modifiée (mélange de 66 % d'O_2 - dioxygène, 25 % de CO_2 et 9 % de N_2 - diazote) à 5 °C (Stoops *et al*., 2015). Les conditions de fabrication et de stockage des produits sont des paramètres essentiels qui vont façonner l'écosystème bactérien. L'altération est ainsi engendrée par le développement d'une petite fraction de la flore initialement présente qui devient dominante au cours du stockage (Jay *et al*., 2003 ; Koutsoumanis et Sofos, 2004) et atteint des taux de population supérieurs à 7,0 log_{10} UFC.g^{-1}. Ce seuil est communément signalé comme seuil bactérien entrainant la dégradation organoleptique des produits (Koutsoumanis *et al*., 2008 ; Degirmencioglu *et al*., 2012 ; Stoops *et al*., 2015).

Malgré le poids économique de l'altération pour la filière viande, les espèces bactériennes responsables de l'altération des produits sont relativement moins étudiées par les microbiologistes que les bactéries pathogènes ou les bactéries d'intérêt technologique. Il est tout de même possible d'établir un inventaire des espèces impliquées dans ce phénomène (Tableau 3). Ces espèces bactériennes ont principalement été mises en évidence par des approches de microbiologie culturale et leur implication dans l'altération a été déterminée en corrélant leur présence à des critères sensoriels et physico-chimiques descriptifs de l'altération. Cependant, les méthodes de cultures conventionnelles révèlent de nombreuses anomalies de comptage et sous-estiment la richesse bactérienne d'un produit altéré ce qui apporte un biais à la caractérisation des bactéries impliquées dans ce phénomène.

Tableau 3 : espèces répertoriées comme potentiellement altérantes dans les produits carnés

Groupes et espèces bactériens	**Caractéristiques bactériologiques**	**Origine de la contamination de la viande**	**Conditions d'isolement**	**Potentiel altérant**	**Références**
Pseudomonas *P. fragi* *P. ludensis* *P. fluorescens*	- Phylum des *Proteobacteria*, ordre des *Pseudomonadales* et famille des *Pseudomonadaceae* - Bactéries à Gram négatif - T°C : 10 à 45 °C, avec prolifération lente entre 0 °C et 10 °C - Croissance ralentie en présence de CO_2	- Présence dans l'usine de transformation, et notamment les chambres froides	- Sous air (présence d'O_2) - Sous vide dans une moindre mesure (et en particulier *P. fragi*)	- Activités protéolytiques et lipolytiques - Poissage - Verdissement (*P. fluorescens*)	Labadie, 1999 ; Bornert, 2000 ; Liu *et al*., 2006 ; Ercolini *et al*., 2007 ; Franzetti et Scarpellini, 2007 ; Doulgeraki *et al*., 2012 ; Casaburi *et al*., 2015
Brochothrix thermosphacta	- Phylum des *Firmicutes*, ordre des *Bacillales* et famille des *Listeriaceae* - Bactéries à Gram positif - T°C : 0 à 30 °C, mais thermosensibles - Anaérobie facultative	- Pas clairement établie	- Sous air - Sous atmosphère modifiée (absence d'O_2)	- Activités protéolytiques : dégradation des acides aminés en amines biogènes : histamine et tyramine - Activités glycolytiques : libération d'acide acétique et d'acetoïne (odeur de rance)	Dainty et Hibbard, 1983 ; Borch et al., 1996 ; Russo *et al*., 2006 ; Nowak *et al*., 2012 ; Papadopoulou *et al*., 2012 ; Casaburi *et al*., 2014 ; Hultman *et al*., 2015 ; Nieminen *et al*., 2015
Lactobacillus	- Phylum des *Firmicutes*, ordre des *Lactobacillales* et famille des *Lactobacillaceae* - Bactéries à Gram positif - T°C : 4 °C à 42 °C (< 30 °C pour *L. algidus*) - Anaérobies aérotolérants - Homofermentaires et hétérofermentaires - *L. algidus* : difficultés de croissance sur milieu de laboratoire	- Présence dans le tractus gastro-intestinal des animaux - Contamination par la matière première			
L. sakei *L. graminis* *L. curvatus* *L. fuchuensis*			- Sous atmosphère modifiée - Sous vide	- Implication controversée puisqu'il s'agit d'un ferment et est aussi utilisé en tant qu'agent de bio-protection	Champomier-Vergès *et al*., 2001 ; Ammor *et al*., 2005 ; Benson *et al*., 2014 ; Jääskeläinen *et al*., 2016
L. algidus					Kato *et al*., 2000 ; Schirmer *et al*., 2009 ; Doulgeraki *et al*., 2012 ; Jääskeläinen *et al*., 2016
Lactococcus *L. piscium*	- Phylum des *Firmicutes*, ordre des *Lactobacillales* et famille des *Streptococcaceae* - Bactéries à Gram positif - T°C : 5 °C à 30 °C - Anaérobies aérotolérants - Homofermentaires	- Pas clairement établie	- Sous atmosphère modifiée - Sous vide	- Implication controversée puisqu'il s'agit également d'un agent de bio-protection	Sakala *et al*., 2002 ; Björkroth 2005 ; Nieminen *et al*., 2015 ; Jääskeläinen *et al*., 2016 ; Saraoui *et al*., 2016

Leuconostoc *L. mesenteroides* *L. gelidum* *L. gasicomitatum* *L. carnosum*	- Phylum des *Firmicutes*, ordre des *Lactobacillales* et famille des *Leuconostocaceae* - Bactéries à Gram positif - T°C : < 15 °C - Anaérobies facultatives - Hétérofermentaires	- Présence dans l'environnement de l'usine de transformation - Contamination par la matière première	- Sous atmosphère modifiée - Sous vide	- Production d'acides organiques - Activités lipolytiques : libération d'acides gras volatils - Poissage (dextrane) - Production de gaz	Björkroth 2005 ; Diez *et al*., 2009 ; Doulgeraki *et al*., 2012 ; Jääskelainen *et al*., 2013 ; Pothakos *et al*., 2015 ; Casaburi *et al*., 2015 ; Jääskeläinen *et al*., 2016
Weissella *W. viridescens* (anciennement *Lactobacillus viridescens*) *W. hellenica*	- Phylum des *Firmicutes*, ordre des *Lactobacillales* et famille des *Leuconostocaceae* - Bactéries à Gram positif - T°C : 4 °C à 45 °C - Anaérobies facultatives - Hétérofermentaires	- Présence sur la peau des animaux - Présence dans le tractus gastro-intestinal des animaux - Présence dans l'usine de transformation	- Sous atmosphère modifiée - Sous vide	- Verdissement - Poissage - Production de CO_2 - Activité glycolytique : production d'ammoniac, d'éthanol et d'acétate	Collins *et al*., 1993 ; Nychas *et al*., 2008 ; Diez *et al*., 2009 ; Doulgeraki *et al*., 2010 ; Comi et Iacumin, 2012 ; Dušková *et al*., 2013 ; Fusco *et al*., 2015 ; Nieminen *et al*., 2015
Carnobacterium *C. divergens* *C. maltaromaticum*	- Phylum des *Firmicutes*, ordre des *Lactobacillales* et famille des *Carnobacteriaceae* - Bactéries à Gram positif - T°C : -1,5 °C à 40 °C - Anaérobies aérotolérants - Faiblement hétérofermentaires	- Pas clairement établie	- Sous air - Sous atmosphère modifiée - Sous vide	- Production d'acétoïne, acides, alcools - Implication controversée puisqu'il s'agit également d'un agent de bio-protection	Leisner *et al*., 2007 ; Benson *et al*., 2014 ; Casaburi *et al*., 2015 ; Nieminen *et al*., 2015
Enterobacteriaceae *Serratia* *S. proteamaculans* *S. liquefaciens* *Hafnia* *Rahnella* *Yersinia*	- Phylum des *Proteobacteria*, ordre des *Enterobacteriales* - Bactéries à Gram négatif - T°C : 0 °C à 45 °C - Aéro-anaérobies facultatifs - Homofermentaires et hétérofermentaires	- Présence dans le tractus gastro-intestinal des animaux - Présence dans l'usine de transformation	- Sous atmosphère modifiée - Sous vide	- Activités protéolytiques : dégradation des acides aminés - Production de gaz	Dainty *et al*., 1986 ; Borch, *et al*., 1996 ; Lorenzo *et al*., 2010 ; Doulgeraki *et al*., 2011 ; De Filippis *et al*., 2013a ; De Filippis *et al*., 2013b ; Säde *et al*., 2013 ; Remenant *et al*., 2015

Les approches moléculaires, s'affranchissant des étapes de culture, permettent d'accéder à une description plus précise des espèces bactériennes altérantes. Ainsi, il a récemment été mis en évidence la présence d'une cinquantaine d'espèces bactériennes constituant le noyau bactérien, réservoir de diverses espèces bactériennes pouvant contribuer à l'altération des produits carnés (Chaillou *et al*., 2015). Ce noyau de bactéries psychrotrophes (Chaillou *et al*., 2015) capables de se développer à des températures inférieures à 7 °C (Bornert, 2000) est composé de bactéries à Gram positif, et plus spécialement, des bactéries de l'ordre des *Lactobacillales* telles que les *Carnobacterium*, les *Lactobacillus*, les *Leuconostoc* ou encore les *Lactococcus* qui sont dominantes dans les produits carnés altérés (Ercolini *et al*., 2009 ; Benson *et al*., 2014 ; Chaillou *et al*., 2015 ; Remenant *et al*., 2015). Parmi les bactéries à Gram positif, *B. thermosphacta* est une des plus importantes bactéries psychrophiles connue comme bactérie altérante de diverses matrices alimentaires (Nychas *et al*., 2008). Parmi les bactéries à Gram négatif, les espèces du genre *Pseudomonas* sont souvent isolées de produits carnés altérés (Casaburi *et al*., 2015). Enfin, les espèces d'*Enterobacteriaceae* appartenant aux genres *Serratia*, *Hafnia* ou encore *Rahnella*, marqueurs de l'hygiène des procédés de fabrication (Nychas *et al*., 2008), contribuent également à l'altération des produits carnés (Doulgeraki *et al*., 2011 ; Säde *et al*., 2013 ; Remenant *et al*., 2015).

2.2.3.3. Le processus d'altération : le résultat d'activités métaboliques diverses

L'altération des produits carnés dépend des bactéries présentes dans la matrice, de la disponibilité des substrats pour leur croissance, et surtout des facteurs environnementaux (facteurs biotiques et abiotiques). Les défauts d'altération sont la modification de l'aspect des produits et/ou la modification olfactive et gustative des produits.

2.2.3.3.1. Modification visuelle de l'aspect des produits

La myoglobine, dont le noyau est un groupement hème, est le pigment principal de la viande fraîche qui lui confère une couleur rouge. La couleur de la viande évolue au cours de la conservation et est influencée par deux paramètres principaux : la forme chimique que prend la myoglobine et le développement de micro-organismes. La cause microbienne à la décoloration de la viande au cours de la conservation est la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les bactéries altérantes et notamment dans les produits conservés en présence d'oxygène. L'H_2O_2 oxyde le pigment myoglobine ce qui conduit à la formation de choleglobine (Seideman *et al*., 1984) et cause le verdissement de la viande. Différentes études ont permis de mettre en évidence l'implication de *P. fluorescens* (Chan *et al*., 1998), *W. viridescens* (Diez *et al*., 2009 ; Dušková *et al*., 2013), *L. mesenteroides* (Diez *et al*., 2009) ou encore *L. gasicomitatum* (Johansson *et al*., 2011) dans le verdissement de la viande.

La présence d'un enduit poisseux en surface des produits est également un défaut de qualité. Bien qu'il puisse être observé lors d'une conservation sous air, ce défaut se développe principalement quand les produits sont conservés sous vide. La composition chimique et la formation de ce poissage sont à ce jour peu connues, cependant, les bactéries du genre *Leuconostoc* (hétérofermentaires) sont particulièrement impliquées dans la production de cet enduit par conversion d'un polysaccharide tel que le saccharose en dextrane, polymère ramifié de dextrose (Korkeala *et al*., 1988). D'autres bactéries, telles que *Weissella* (hétérofermentaires également) et *Pseudomonas*, sont aussi impliquées dans la formation de ce poissage à la surface des produits carnés (Bornert, 2000 ; Nychas *et al*., 2008 ; Dušková *et al*., 2013).

2.2.3.3.2. Modifications olfactives et gustatives des produits

Les composés organiques volatils sont impliqués dans les odeurs indésirables d'altération de la viande, ils comprennent (1) les alcools et les esters aux notes fruitées, (2) les cétones et les acides gras volatils contribuant aux odeurs de fromages, d'aigre ou encore d'âcre, (3) les aldéhydes associés à des odeurs de gras/rance ou encore (4) les composés soufrés.

Le glucose, issu de la dégradation du glycogène, est le précurseur de nombreuses molécules odorantes responsables de l'altération de la viande (Casaburi *et al*., 2015). La dégradation du glucose par la voie de la glycolyse entraîne la formation d'acide pyruvique ainsi que d'acide lactique. Le glucose est le premier substrat utilisé par les *Enterobacteriaceae* ainsi que par les espèces de *Pseudomonas* (Nychas *et al*., 2008 ; Casaburi *et al*., 2015). Dans la viande, le glucose est utilisé par voie hétérofermentaire, avec production de CO_2, d'acide acétique et d'éthanol ou par voie homofermentaire, avec la production de deux molécules d'acide lactique à partir d'une molécule de glucose. La production d'acides est un marqueur de l'altération de la viande puisqu'il est responsable d'odeurs aigres et de goûts acides. *L. gasicomitatum* (Jääskelainen *et al*., 2013), *L. sakei*, *L. curvatus* (Hernández-Macedo *et al*., 2012) ou encore *Carnobacterium* spp. (Nychas *et al*., 2008) ont pu être identifiés comme producteurs d'acide acétique lors de la conservation de la viande. Différentes études ont montré que les concentrations en glucose et en acide lactique pourraient ainsi être utilisées pour décrire ou prédire l'altération de la viande (Boers et Djikmann, 1994 ; Seymour *et al*., 1994).

L'éthanol est le substrat préférentiel des bactéries pour la production d'esters. Les esters majoritaires retrouvés dans les produits carnés altérés sont : l'acétate d'éthyle, le butanoate d'éthyle, l'éthyl-3-méthylbutanoate, l'éthyloctanoate, l'éthyle hexénoate et le

décanoate d'éthyle (Casaburi *et al*., 2015). Ces molécules jouent un rôle important dans le profil sensoriel des viandes altérées en contribuant au développement d'odeurs fruitées. Dans une revue récente, Casaburi *et al*., (2015) recensent exhaustivement les espèces bactériennes associées à la production d'esters, mais dans la viande conservée sous air, *Pseudomonas* et notamment *P. fragi* sont reconnus comme étant des producteurs majeurs d'esters (Ercolini *et al*., 2010). Les travaux d'Ercolini *et al*., (2009) mettent en évidence que *Serratia proteamaculans* est également un fort contributeur à la production d'esters. D'autres travaux soulignent également le rôle de *B. thermosphacta* (Casaburi *et al*., 2014) ou encore *Carnobacterium* spp. (La Storia *et al*., 2012) dans la production d'esters par estérification de groupe alcool.

L'acétoïne provient de la fermentation butanediolique du pyruvate en α-acétolactate qui sera décarboxylé en acétoïne, elle-même réduite par le NADH en 2,3-butanediol. *B. thermosphacta* (Dainty et Hibbard 1983 ; Casaburi *et al*., 2015), *Carnobacterium* spp. (Casaburi *et al*., 2011 ; La Storia *et al*., 2012), *Phosphobacterium* spp. (Nieminen *et al*., 2016) ou encore *Lactobacillus* spp. (Dainty et Mackey, 1992) ont été identifiés comme producteurs d'acétoïne. Cette molécule est impliquée dans le développement d'odeurs de « fromage », voire de rance dans les viandes altérées. D'autres cétones ont été détectées dans les viandes altérées conservées sous air ou sous vide : diacétyle, 2-heptanone, 3-octanone et 2-butanone (Casaburi *et al*., 2015) mais l'acétoïne est la cétone la plus fréquemment retrouvée dans la viande altérée, quelles que soient les conditions de conservation.

Les aldéhydes sont également des molécules odorantes identifiées comme des odeurs de beurre, de rance dans les viandes altérées. Ils peuvent provenir de l'hydrolyse des acides gras ou de l'oxydation des lipides qui conduisent à la formation d'hexanal, de nonanal, d'heptanal, de benzaldéhyde et de 3-methylbutanal pour les principaux aldéhydes produits (Jääskelainen *et al*., 2013 ; Casaburi *et al*., 2015). Cependant leur détection reste difficile en

raison de leur faible concentration dans les produits et de leur rapide oxydation dès les premiers jours de stockage. Cette oxydation conduit notamment à la production de divers alcools tels que le 3-méthylbutan-1-ol, le 1-octen-3-ol, le 2-éthylhexanol, le 2,3-butanediol, le butanol, l'heptanol, l'hexanol ou encore le 3-phenoxy-1-propanol (Casaburi *et al*., 2015). Leroy *et al*., (2009) ont notamment mis en évidence une augmentation de la concentration de ces molécules dans du jambon altéré pendant 40 jours de conservation. Ces molécules ont été identifiées dans la viande conservée sous air ou sous vide tandis que le 1-octen-3-ol, odeur de champignon, odeur terreuse, a également été retrouvé dans la viande conservée sous atmosphère modifiée. De nombreuses bactéries ont été identifiées comme productrices de ces molécules alcooliques dans la viande altérée : *C. maltaromaticum* (Casaburi *et al*., 2011), *L. gasicomitatum* (Jääskelainen *et al*., 2013), *Pseudomonas* spp. (La Storia *et al*., 2012), *P. fragi* (Ercolini *et al*., 2010), *S. proteamaculans* (Ercolini *et al*., 2009).

La plupart des composés volatils produits sont le résultat d'une oxydation chimique ou enzymatique des acides gras insaturés de la viande. L'hydrolyse enzymatique (lipolyse) est modulée par des enzymes spécifiques : les lipases, les estérases ou encore les phospholipases. L'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides par les bactéries conduit à la formation d'acides gras volatils (Toldrá, 1998 ; Dave et Ghaly, 2011). *B. thermosphacta* (Dainty et Hibbard, 1983) et *Carnobacterium* spp. (Casaburi *et al*., 2011) sont les producteurs majeurs d'acides gras volatils. L'acide butanoïque est le principal acide carboxylique retrouvé dans la viande altérée en condition anaérobie et est principalement associé aux bactéries lactiques (Casaburi *et* al., 2015), par exemple *L. gasicomitatum* (Jääskelainen *et al*., 2013) dans la viande de porc conservée sous atmosphère modifiée (20 % CO_2 + 80 % N_2) ou *C. maltaromaticum* (Casaburi *et al*., 2011) dans de la viande de bœuf conservée sous vide. *B. thermosphacta* est également associée à la production des acides 2-méthyl butanoïque et 3-

méthyl butanoïque qui sont respectivement associés à des odeurs âcres/acides et aigres (Casaburi *et al*., 2015).

La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres. Le catabolisme de ces derniers est la deuxième source d'énergie pour les micro-organismes dans la viande. La décarboxylation des acides aminés conduit à la formation d'amines biogènes. D'après Brillet (2005), diverses amines biogènes peuvent être produites dans la viande : putrescine (décarboxylation de l'ornithine), tyramine (décarboxylation de la tyrosine), cadavérine (décarboxylation de la lysine) et histamine (décarboxylation de l'histidine). Dans les viandes et les poissons, ces amines biogènes sont des indicateurs d'altération. Ces mécanismes de décarboxylation, induits par des décarboxylases spécifiques, ont été reportés pour de nombreuses bactéries altérantes. *L. curvatus* a été montré comme responsable de la production de grandes quantités de tyramine, de putrescine et de cadavérine dans des saucisses de porc fermentées (Latorre-Moratalla *et al*., 2012). Les travaux de Casaburi *et al*., (2014) ont permis de souligner la capacité de *B. thermosphacta* à produire de l'histamine en milieu de laboratoire et dans la viande, mais les souches testées ne produisaient pas de putrescine, de cadavérine, ni de tyramine. Cependant, l'objectif de ces études était d'étudier l'activité protéolytique et notamment de décarboxylation par les différentes espèces bactériennes, mais sans lien direct avec l'apparition de l'altération. La dégradation de la cystéine et de la méthionine conduit à la formation de composés soufrés, molécules fortement impliquées dans l'altération des produits carnés et particulièrement de la viande de poulet (Casaburi *et al*., 2015).

Les défauts d'altération des produits carnés sont attribuables au développement de bactéries altérantes par l'utilisation des substrats nutritionnels disponibles dans la viande. Ces substrats étant différents selon le type de viande (d'origine bovine, porcine ou encore avicole), les défauts d'altération seront différents selon le produit. Ces descripteurs

d'altération (visuels, olfactifs et/ou gustatifs) ne sont pas facilement associés à des fonctions métaboliques ou enzymatiques particulières. En effet, bon nombre d'études présentées ont rapporté la détection ou la mesure des molécules (composés volatils, amines biogènes, etc.) et ont corrélé la production de ces molécules aux espèces bactériennes présentes dans le produit, voir même à l'espèce bactérienne dominante tandis que les espèces sous-dominantes ont bien souvent été négligées dans la corrélation. Or l'altération des produits carnés est une succession complexe de réactions enzymatiques potentiellement associées à des réactions non enzymatiques provenant du développement des bactéries, mais également de la matrice alimentaire elle-même. Il est donc difficile d'établir une corrélation directe entre la présence d'un défaut organoleptique et la bactérie qui en est responsable. Ainsi, l'écosystème bactérien associé à l'altération est composé de bactéries ayant contribué à l'altération, mais également de bactéries qui se sont développées sans causer de changements organoleptiques.

2.2.3.4. Maîtrise du développement de ces écosystèmes altérants

La maîtrise du développement et de l'activité des écosystèmes bactériens est un enjeu majeur dans la conservation des produits carnés. Plusieurs techniques de conservation peuvent être appliquées. Le concept de « technologies barrière » ou « hurdle technologies » a été introduit en 1992 (Leistner, 1992) et traduit le fait que plus on avance dans le circuit de transformation de la viande, plus les obstacles mis en œuvre pour limiter la croissance des bactéries indésirables sont nombreux. Les méthodes de conservation peuvent être de deux types : (1) des facteurs abiotiques permettant des interactions physico-chimiques sur le vivant et (2) des barrières biotiques résultant des interactions du vivant sur le vivant.

2.2.3.4.1. Barrières abiotiques

La première barrière rencontrée par les bactéries est constituée des ingrédients utilisés lors de la préparation des produits. Dans les produits carnés transformés, le sel est utilisé pour

ses propriétés organoleptiques, mais également pour ses propriétés bactériostatiques. Par cette dernière, le sel participe à l'amélioration de la durée de vie des produits. L'ajout de 3 % de chlorure de sodium [NaCl (m/m)] dans la viande de poulet, de mouton ou de bœuf a réduit de plus d'un log la flore totale cultivable, par rapport à leurs homologues non salés [réduction de 1,3 à 1,8 $\log_{10}$UFC.g^{-1} selon les produits (Anbalagan *et al*., 2014)]. De même, Whiting *et al*., (1984) ont constaté une croissance plus lente de la flore totale cultivable avec 2,5 % de NaCl (m/m) contre 1,5 % de NaCl (m/m) dans des saucisses de Francfort cuites pendant 11 jours de conservation sous air. L'ajout de sel peut causer un changement de composition microbienne en inhibant les micro-organismes sensibles au NaCl tels que les *Pseudomonas* ou les *Enterobacteriaceae* au profit de bactéries halotolérantes telles que les bactéries lactiques à priori moins préjudiciables pour la qualité des produits (Blickstaf et Molin 1983). Pour améliorer son efficacité vis-à-vis d'espèces bactériennes altérantes, le sel peut être combiné à plusieurs paramètres. C'est le cas par exemple de l'utilisation des hautes pressions (350 MPa) qui, combinées à 3 % de NaCl (m/m), ont permis de réduire la flore lactique de la viande de porc à moins de 2 $\log_{10}$UFC.g^{-1} (après 12 jours de conservation à : 2 jours à 4 °C, 4 h à 20 °C et 8 jours à 8 °C) contre plus de 6 $\log_{10}$UFC.g^{-1} pour les produits sans sel et non traités aux hautes pressions et plus de 4 $\log_{10}$UFC.g^{-1} pour les produits sans sel, mais traités aux hautes pressions (Duranton *et al*., 2012).

Certaines épices sont également utilisées dans les préparations des produits carnés et ont été signalées comme ayant des activités bactériostatiques. Cet effet inhibiteur est principalement dû aux composés aromatiques volatils présents dans leur composition (Ağaoğlu *et al*., 2007). Ouattara *et al*., (1997) ont montré en milieu de laboratoire l'efficacité de 8 huiles essentielles vis-à-vis de la croissance de bactéries d'altération : *P. fluorescens*, *S. liquefaciens*, *B. thermosphacta*, *C. piscicola*, *L. curvatus* et *L. sakei.* Récemment, Schirmer et Langsrud (2010) ont testé l'effet inhibiteur de substances naturelles (composés actifs dans

les épices) sur la croissance de bactéries d'altération de la viande de porc : *L. algidus*, *L. mesenteroides*, *L. carnosum*, *C. maltaromaticum*, *C. divergens*, *B. thermosphacta* et *S. proteamaculans*. Bien que ces substances naturelles aient eu un effet inhibiteur vis-à-vis de ces bactéries, démontré en milieux de laboratoire, cet effet n'a plus été mis en évidence dans la viande, même à des concentrations dix fois supérieures à la concentration minimale inhibitrice. Le rôle des épices dans les produits carnés serait donc essentiellement organoleptique et leur rôle bactériostatique n'aurait d'intérêt que lorsque les bactéries sont en contact direct avec les épices.

Outre l'utilisation du sel, l'utilisation d'additifs est une méthode efficace pour limiter le développement des bactéries altérantes et prolonger la durée de vie des produits. Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité du lactate de sodium dans la conservation de saucisses de porc fraîches. L'utilisation de ce conservateur a permis (i) de réduire la décoloration et le développement d'odeurs indésirables définies comme des odeurs aigres (Lamkey *et al*., 1991), (ii) d'augmenter la phase de latence des bactéries et donc retarder leur développement bactérien dans des saucisses de porc fraîches (Brewer *et al*., 1991), (iii) de réduire de plus de 2 $\log_{10}$UFC.g^{-1} la charge bactérienne totale de saucisses de porc cuites (Malicki *et al*., 2004) et (iv) de ralentir la vitesse de croissance et de réduire le taux de population de *Aerococcus viridans* et *W. viridescens* dans de la viande de bœuf (Peirson, 2003). Récemment, Benson *et al*., (2014) ont étudié la croissance des flores aérobies mésophiles et psychrotrophes, des bactéries lactiques et des *Enterobacteriaceae* dans des saucisses de porc contenant 0, 3, 4, 5 ou 6 % d'un mélange de lactate et diacétate de sodium. L'ajout de ce mélange permettait de réduire significativement la croissance des quatre populations bactériennes suivies et les auteurs ont relié le retard d'apparition de l'altération des saucisses à l'utilisation de ces conservateurs.

Le conditionnement des produits carnés est une méthode bien connue qui permet de prolonger la durée de vie des produits. Il est bien connu que le stockage des produits carnés sous air favorise le développement de *Pseudomonas* spp. (Labadie, 1999 ; Ercolini *et al*., 2007) et dans une moindre mesure celui de *B. thermosphacta* (Labadie, 1999 ; Papadopoulou *et al*., 2012). L'amélioration de la conservation passe par le conditionnement des produits carnés qui peut être de deux types : (1) conditionnement sous atmosphère modifiée et (2) conditionnement sous vide. Le conditionnement sous atmosphère modifiée consiste à remplacer l'air présent par un mélange gazeux contenant différents niveaux d'O_2 et de CO_2, équilibré avec du N_2. Dès 30 % de CO_2, la croissance de *Pseudomonas* serait inhibée (Doulgeraki *et al*., 2012). Cependant, Liu et al., (2006) et Ercolini *et al*., (2010) soulignent la croissance de *P. fragi* dans de la viande conservée sous atmosphère modifiée en présence de 40 % de CO_2. Les conditions anaérobies de conservation (sous vide ou sous atmosphère modifiée) exercent une pression sélective sur les communautés bactériennes (Martínez *et al*., 2005 ; Doulgeraki *et al*., 2010 ; Esmer *et al*., 2011 ; Degirmencioglu *et al*., 2012) au profit de bactéries anaérobies tolérantes à Gram positif telles *B. thermosphacta* ou encore d'espèces du genre *Lactobacillus* devenant dominantes (Doulgeraki *et al*., 2010). Jääskeläinen et *al*., (2016) ont par exemple identifié *Lactococcus* et *Lactobacillus* comme genres dominants dans la viande de bœuf conservée sous vide pendant 14 jours à 6 °C. De même, Piotrowska-Cyplik *et al*., (2016) ont identifié *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Microcoacceae* comme les familles bactériennes dominantes dans du jambon conservé sous vide pendant 30 jours à 4 °C. Dans la viande de porc conservée sous atmosphère modifiée, *B. thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp. et *Photobacterium* spp. prédominent (Nieminen *et al*., 2015). Le type de conditionnement est un paramètre essentiel qui va conditionner le développement d'un certain type de flore bactérienne.

Une barrière supplémentaire à la maîtrise des communautés bactériennes altérantes est la température de stockage. Ce paramètre est essentiel puisqu'il affecte le temps de latence et le taux de croissance bactérien ainsi que le taux de population maximal atteint (Borch *et al*., 1996 ; Doulgeraki *et al*., 2012). Ceci est d'autant plus important pour les produits carnés frais ou crus, où aucun traitement de décontamination (thermique par exemple) n'est appliqué lors de la fabrication. Les bactéries psychrotrophes, capables de se développer à des températures inférieures à 7 °C (Bornert, 2000), appartiennent aussi bien aux bactéries à Gram positif, telles que les *Lactobacillaceae* ou les *Carnobacteriaceae*, qu'aux bactéries à Gram négatif, comme les *Pseudomonas* spp. ou les *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki *et al*., 2012).

2.2.3.4.2. Barrières biotiques

La bio-préservation est une méthode de conservation des aliments faisant appel à l'utilisation de micro-organismes, ou à leurs métabolites. La notion de bio-préservation est connue par le biais de la fermentation utilisée par l'Homme depuis l'Antiquité, comme mode de conservation des aliments. L'effet bio-préservant résulte de la modification physico-chimique du produit sous l'action des ferments rendant défavorables les conditions de croissance pour les bactéries pathogènes ou altérantes. Cependant, dans les produits carnés frais ou transformés non fermentés, l'enjeu de la bio-préservation est d'empêcher la survie ou la croissance de ces bactéries, mais sans modifier les propriétés physico-chimiques et organoleptiques des produits. Les études d'efficacité de la bio-préservation dans les produits non fermentés ont d'abord ciblé les bactéries pathogènes et principalement *L. monocytogenes* (Jacobsen *et al*., 2003 ; Vermeiren *et al*., 2006 ; Maragkoudakis *et al*., 2009 ; Sakaridis *et al*., 2012) ou *Salmonella* ser. Typhimurium et *E. coli* (Chaillou *et al*., 2014). Cette technique de bio-préservation a également été testée vis-à-vis d'espèces altérantes des produits carnés. L'utilisation de *L. sakei* est particulièrement efficace pour inhiber la croissance de bactéries altérantes (*L. curvatus* et *L. mesenteroides*) dans du jambon cuit (Hu *et al*., 2008). Les

caractéristiques sensorielles du produit (couleur, texture, odeurs et goûts) ont ainsi été nettement améliorées et sa conservation a été plus longue, 35 jours de conservation sous vide à 4 °C contre 15 jours sans la souche de bio-protection. Vasilopoulos *et al*., (2010) ont mis en évidence que l'ajout de *L. carnosum* inhibait la croissance de l'écosystème naturel et notamment de *B. thermosphacta* et *Carnobacterium* spp. dans du jambon cuit dès les premiers jours de conservation sous atmosphère modifiée (mélange de 70 % de N_2 et 30 % de CO_2) à 7 °C. Ceci a conduit à une durée de vie plus longue des produits (de 27 jours contre 21 jours pour les jambons non traités).

En résumé, les bactéries d'altération sont naturellement présentes dans les produits carnés. Leur développement peut entrainer l'altération des produits. Il est donc nécessaire de développer des stratégies ciblées afin de réduire leur développement et augmenter la durée de vie des produits. Cependant, la maîtrise de ces bactéries passe avant tout par leur caractérisation et la compréhension du mécanisme d'altération dans les produits.

2.2.4. La présence accidentelle de bactéries pathogènes de la viande : le cas de *Salmonella enterica*

La viande peut également être, accidentellement, contaminée par des agents bactériens pathogènes. Les TIA résultent de l'ingestion de denrées alimentaires contaminées par un ou plusieurs agent(s) pathogène(s) et/ou par les toxines qu'ils produisent. Dans les produits carnés, les espèces pathogènes potentielles sont *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* ou encore *Yersinia enterocolitica*. En 2013, en Europe, 5 196 TIA ont été déclarées, dont la majorité des cas identifiés, soit 22,5 %, étaient imputables à *Salmonella* (Figure 2). De plus, bien que la majorité des cas de salmonellose soient bénins, il arrive que certaines personnes décèdent des suites d'une contamination par *Salmonella*. La gravité de l'infection dépend de facteurs liés à l'hôte et de la souche de

Salmonella impliquée. Cette espèce bactérienne est un agent infectieux au cœur des problématiques de santé publique et des surveillances sanitaires des produits alimentaires.

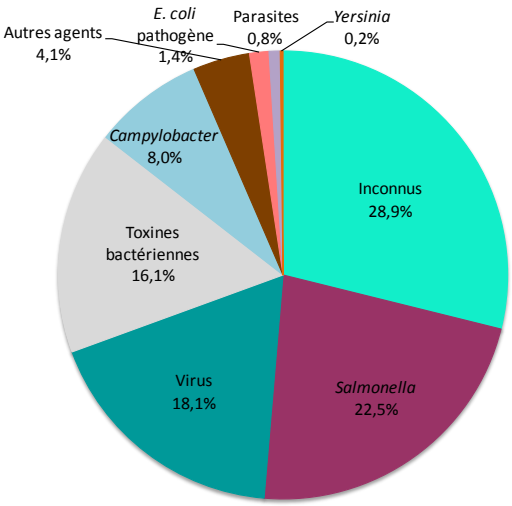


Figure 2 : origines microbiennes des TIA en Europe en 2013 (source : EFSA, 2015)

Les virus incluent calicivirus, le virus de l'hépatite A, le flavivirus et le rotavirus. Les toxines bactériennes incluent les toxines produites par *Bacillus*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. Les autres agents incluent *Listeria*, *Brucella*, *Shigella*, *Vibrio*, les mycotoxines, l'histamine, les toxines marines et l'atropine. Les parasites incluent *Trichinella*, *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Anisakis*.

2.2.4.1. Caractéristiques bactériologiques et nomenclature

Le genre *Salmonella*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, comprend deux espèces génomiques : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* est elle-même subdivisée en 6 sous-espèces (I. *enterica*, II. *salamae*, IIIa. *arizonae*, IIIb. *diarizonae*, IV. *houtenae* et VI. *indica*). Les sous-espèces de *Salmonella enterica* sont subdivisées en sérotypes selon trois caractères antigéniques (1) antigènes somatiques Ag O (de nature polysaccharidique) localisés dans la paroi bactérienne, (2) antigènes flagellaires Ag H (de nature protéique) localisés au niveau des flagelles et antigènes capsulaires d'enveloppe Vi. La classification des souches de *Salmonella* par Kauffmann et White en sérotypes, dès 1934, repose sur la combinaison des facteurs O et H. À ce jour, on estime à plus de 2 600 les sérotypes de *Salmonella* décrits. La liste complète des sérotypes répertoriés

est disponible sur le site web de l'Institut Pasteur (Grimont et Weill, 2007). La combinaison espèce / sous-espèce / sérotype rend le nom complet des espèces de *Salmonella* particulièrement long. Pour cette raison, dans la suite du manuscrit nous utiliserons une dénomination raccourcie : *Salmonella* ser. Typhimurium pour *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. En Europe, parmi les sérotypes les plus répandus, le sérotype *Salmonella* ser. Typhimurium est prédominant dans les infections à *Salmonella*, tandis que le sérotype *Salmonella* ser. Enteritidis est en baisse constante. Cependant, toute *Salmonella*, quel que soit son sérotype, peut être responsable de toxi-infection après consommation d'un aliment contaminé.

2.2.4.2. Présence de *Salmonella enterica* dans la viande

Principalement présente dans le tractus gastro-intestinal de l'Homme et de nombreux animaux d'élevage ou sauvages, *Salmonella* est capable de survivre ou de se développer dans de nombreux écosystèmes. Même s'il existe des différences de répartition et de spécificités selon les espèces animales hôtes (ex : *Salmonella* ser. Arbortusovis chez les ovins, *Salmonella* ser. Arbortus Equi chez les équins, ou encore *Salmonella* ser. Gallinarum chez les volailles), les différents sérotypes de *Salmonella* ne sont pas spécifiques à une espèce animale donnée. Néanmoins, en Europe en 2013, *Salmonella* ser. Enteritidis était fréquemment isolée de viande de volaille et *Salmonella* ser. Typhimurium était le sérotype le plus fréquemment reporté chez les porcs (47,8 %) et la viande de porc (30,7 %) suivi par *Salmonella* ser. Derby (14,8 % et 27,1 %, respectivement) (EFSA, 2015).

La principale voie de transmission du pathogène à l'Homme est la chaîne alimentaire. En 2014, la viande de porc et ses produits dérivés étaient la troisième cause d'infections humaines à *Salmonella* derrière les viandes de volaille et les ovoproduits (EFSA, 2015). La contamination des produits carnés issus de la filière porc par *Salmonella* a plusieurs origines :

les cultures, l'environnement de l'élevage, l'alimentation des animaux et la transformation de la viande (Lo Fo Wong *et al*., 2002). Cependant, la contamination principale a lieu au cours de l'abattage et notamment lors de l'éviscération de l'animal, où la libération de matières fécales (de 10^{10} à 10^{12} bactéries par gramme de fèces) peut entraîner la contamination accidentelle de la carcasse par le pathogène (Giaccone *et al*., 2012). De plus, lors de la préparation/transformation des produits, la viande peut être contaminée par contact avec des surfaces ou matériaux tels que couteaux, tapis de convoyage, mains, etc. ou par contact avec un autre aliment contaminé, on parle alors de contamination croisée. La réglementation européenne (CE, 2160-2003) impose l'absence de *Salmonella* dans 25 g de produit (détectée par méthode culturale), de la sortie d'usine de fabrication à la date limite de consommation.

2.2.4.3. Pathogénicité et virulence de *Salmonella* ser. Typhimurium

Bien que le taux de contamination initial dans les produits carnés soit faible (< 10-100 UFC.g^{-1}), la pathogénicité de la souche peut être exprimée. Les mécanismes de pathogénicité de *Salmonella* ser. Typhimurium sont bien décrits dans la littérature (D'Aoust, 1991 ; Millemann, 1998 ; Marcus *et al*., 2000 ; López *et al*., 2012 ; Fabrega et Vila, 2013), mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. En outre, ce pathogène possède de nombreux facteurs de virulence, dont les gènes qui codent pour ces facteurs peuvent se situer sur un plasmide ou bien sur le chromosome, et ce, de façon isolée en opéron ou bien au sein des régions appelées « îlots de pathogénicité », SPI (*Salmonella* Pathogenicity Islands) dont une vingtaine a été identifiée (Hensel, 2004) et cinq (SPI-1 à SPI-5) sont clairement impliqués dans la virulence de *Salmonella* ser. Typhimurium (Fabrega et Vila, 2013). Ces facteurs de virulence lui permettent de s'adapter aux conditions de l'environnement et à la réponse de l'hôte. Les principaux facteurs de virulence sont la résistance à l'acidité de l'estomac (pH < 1,5) par activation d'un système de réponse appelé ATR, Acid Tolerance Response (Álvarez-Ordóñez *et al*., 2012), l'invasion et l'adhésion à la barrière intestinale. Fabrega et

Vila, (2013) ont répertorié 46 protéines et déterminants de virulence contribuant à la pathogénicité de *Salmonella* ser. Typhimurium, cependant, il est estimé que 4 % du génome (~ 200 gènes) est impliqué dans l'infection des souris (Bowe *et al*., 1998).

2.2.4.4. Maîtrise de la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans les produits carnés et mécanismes d'adaptation du pathogène à cet environnement

Même si une contamination accidentelle a pu avoir lieu, les facteurs de stress rencontrés lors de la transformation et de la conservation des produits peuvent avoir un effet sur la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium et sur sa virulence lors de son infection chez l'hôte.

Le pH optimum pour la croissance de *Salmonella* est généralement compris entre 7,0 et 7,5 (Tableau 4) avec des possibilités de croissance à des valeurs de pH allant de 4,5 à 9,0.

Tableau 4 : limites et optimum de croissance de *Salmonella* spp. sous différents paramètres

Conditions	Minimum	Optimum	Maximum
pH	4,00 (3,80*)	7,0-7,5	9,50
a_w	0,94 (0,90*)	--	--
T°C	7,0°C (5,2°C *)	35°C -43°C	46,2°C (49,3°C *)

* quelques sérotypes, source : adapté de Giaccone 2012

La baisse de pH, lors de la transformation des produits, peut réduire le développement de *Salmonella* ser. Typhimurium. Creţu *et al*., (2016) ont testé l'efficacité d'un traitement à l'acide lactique (1 % v/v) pour décontaminer les carcasses de poulet. Ils ont ainsi mis en évidence que dans 95,3 % des échantillons traités, *Salmonella* n'était pas détectée contre 85,9 % des échantillons non traités. Cependant, son système adaptatif de réponse au stress acide (ATR) lui permet de résister à l'acidité du tractus gastro-intestinal de l'hôte (pH < 1,5). Bon nombre d'études caractérisant ce système de réponse ont été menées en milieux de

laboratoire (Álvarez-Ordóñez *et al*., 2012) mais peu ont porté sur la pertinence de cette réponse adaptative pour la survie du pathogène dans les aliments. Cependant, adaptée au stress acide, *Salmonella* ser. Typhimurium, est capable de survire plus de deux mois dans du cheddar, du fromage suisse ou encore de la mozzarella (Leyer et Johnson, 1992). Des résultats similaires ont été observés dans des produits fermentés (Shen *et al*., 2007) et dans des jus de fruits (Álvarez-Ordóñez *et al*., 2009). L'acidité du tractus gastro-intestinal est le premier facteur de stress rencontré par le pathogène après l'ingestion de l'aliment contaminé. Le développement d'une réponse adaptative à un premier stress acide (dans l'aliment par exemple) est un élément important à prendre en compte parce que non seulement ce mécanisme de réponse lui permet d'augmenter ses capacités de survie dans les aliments, mais surtout il renforce sa résistance à l'acidité du tractus gastro-intestinal et favorise son pouvoir de virulence (Perez *et al*., 2010).

De par sa teneur élevée en eau (> 70 % m/m) et son a_w proche de 0,99, la viande fraîche est un aliment propice au développement de *Salmonella* puisque son a_w minimum pour croître est de 0,94 (Tableau 4). L'ajout de sel (NaCl) dans les produits alimentaires permet d'abaisser cet a_w. En présence de 3 à 4 % de NaCl (m/m), la croissance de *Salmonella* est généralement ralentie ou inhibée (D'Aoust, 1991). Si la réponse adaptative des bactéries face au stress osmotique est un processus bien décrit (Jovanovich *et al*., 1988 ; Csonka, 1989 ; Zhou *et al*., 2011) les études ont été menées en milieu modèle de laboratoire où les conditions sont rendues favorables à leur croissance. Les mécanismes de réponses physiologiques et adaptatives de *Salmonella* aux produits carnés et à la présence de sel dans ces produits sont à ce jour peu connus. Dans les produits carnés, le lactate et le diacétate de sodium peuvent être utilisés pour limiter la croissance de micro-organismes indésirables. La combinaison de ces deux conservateurs [2,5 % (m/m) de lactate de sodium + 0,2 % (m/m) de diacétate de sodium] est efficace pour réduire d'un log la croissance de *Salmonella* dans de la viande de bœuf, dès

10 jours de conservation à 5 °C (Mbandi et Shelef, 2002). En plus de l'ajout de divers conservateurs dans certaines préparations, des épices peuvent être utilisées. Si l'effet bactériostatique des épices vis-à-vis de *Salmonella* a été démontré en milieu de laboratoire (Uhart *et al*., 2006), l'effet inhibiteur est réduit lorsque les épices sont dans un milieu complexe, telle que la viande hachée, et non en contact direct avec le pathogène (Uhart *et al*., 2006).

Il est maintenant bien démontré que le conditionnement sous atmosphère modifiée avec la présence de CO_2 est une méthode efficace pour réduire le développement de bactéries altérantes ou pathogènes. Cependant, *Salmonella*, bactérie anaérobie facultative, est capable survivre dans des produits carnés sous des atmosphères contenant différentes teneurs en CO_2 (Nychas et Tassou, 1996 ; Skandamis *et al*., 2002). Hulankova *et al*., (2010) ont notamment mis en évidence que l'utilisation d'un mélange gazeux composé de 30 % de CO_2 et 70 % de N_2 permettait de réduire d'un log le taux de *Salmonella* dans de la viande de poulet conservée à 5 °C. Cependant, le pathogène est tout de même capable de survivre en présence de CO_2. Le CO_2 pourrait avoir plusieurs effets sur la physiologie cellulaire du pathogène, puisqu'il modifie les propriétés membranaires, le pH intracellulaire et interfère avec les réactions de carboxylation. À ce jour, il n'y a pas d'étude traitant de la réponse physiologique et des mécanismes mis en œuvre pour expliquer les raisons de sa survie dans les produits carnés conditionnés avec du CO_2.

Les produits carnés étant composés d'une communauté bactérienne naturelle variée celle-ci, par compétition de substrat ou inhibition, peut influencer le développement de *Salmonella*. C'est sur cette hypothèse que Møller *et al*., (2013) ont basé leurs travaux et ont montré que la présence de la flore naturelle à 10^9 UFC.g^{-1} dans la viande de porc crue réduisait voire inhibait la croissance de *Salmonella*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Oscar (2006) et de Zaher et Fujikawa (2011) où la flore naturellement présente (~1,2.10^7

UFC.g^{-1}) a pu réduire la croissance de *Salmonella* dans la viande de poulet hachée crue. De même, l'ajout de flore protectrice, telle que *L. sakei* a permis de réduire de 2,0 $\log_{10}$UFC.g^{-1} la croissance de *Salmonella* dans de la viande de bœuf hachée conservée 14 jours sous vide à 8 °C (Chaillou *et al*., 2014). Par ailleurs, certaines études ont montré que la présence de bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) affectait également l'expression des gènes de virulence de *Campylobacter jejuni* (Ding *et al*., 2005), *E. coli* O157 : H7 (Medellin-Pena *et al*., 2007) et *Salmonella* ser. Typhimurium (Bayoumi et Griffiths, 2012). *In vitro*, *B. bifidum* est capable d'interférer dans l'invasion et l'attachement aux cellules épithéliales de *Salmonella* ser. Typhimurium en réduisant l'expression des gènes des facteurs de virulence essentiels à ces deux étapes de pathogénicité (Bayoumi et Griffiths, 2012). La présence de flores bactériennes annexes (naturellement présentes ou flores technologiques) permet donc de diminuer la croissance de *Salmonella*. Cependant, à ce jour, il n'existe pas d'étude relative à la réponse physiologique de *Salmonella* ser. Typhimurium en présence de ces flores annexes.

Malgré les conditions d'hygiène et de manipulations strictes au sein des usines de transformation de viandes, la combinaison des différents facteurs environnementaux peut réduire les capacités de croissance du pathogène dans la viande. Cependant, si les conditions de stress sont à des niveaux trop faibles, *Salmonella* peut s'adapter en activant des mécanismes de protection, en synthétisant des protéines qui lui permettent d'améliorer sa résistance aux divers stress qu'elle peut rencontrer. De récents travaux (Pin *et al*., 2012) ont pu mettre en évidence que la mise en mémoire des gènes impliqués dans cette résistance peut provoquer l'augmentation de la résistance de *Salmonella* ser. Typhimurium face à un stress. Enfin, l'étude de la présence de *Salmonella* ser. Typhimurium dans les produits carnés doit être faite en interaction entre l'environnement dans lequel le pathogène se trouve. Le développement des techniques de séquençage représente une opportunité d'étudier la

communauté microbienne des produits carnés dans sa globalité et ainsi permet d'étudier plus précisément la physiologie des micro-organismes, et notamment des pathogènes, directement dans l'environnement d'étude.

2.3. L'écologie microbienne des aliments

2.3.1. Notions d'écologie microbienne

En écologie microbienne, la communauté microbienne est définie comme l'ensemble de la population, i.e. des individus de différentes espèces microbiennes qui coexistent en même temps et dans un même endroit (Begon *et al*., 2006). La structure de cette communauté va donc être soumise à des fluctuations temporelles et spatiales qui vont correspondre à des phases de remplacement d'individus plus adaptés à l'environnement dans lequel ils se trouvent. Les facteurs environnementaux qui peuvent influer sur la composition de la communauté microbienne sont la disponibilité en sources de carbone, la température, le pH, la teneur en eau disponible ou encore l'environnement gazeux, mais de fortes interactions peuvent se produire au sein de la communauté (compétition, synergie, etc.). Ainsi, l'écosystème microbien est l'ensemble dynamique au sein duquel interagit la communauté microbienne avec l'environnement dont elle est issue.

2.3.2. La structure d'une communauté microbienne

Pour mesurer la diversité en espèces d'une communauté microbienne, le premier critère de caractérisation est la mesure de la richesse microbienne, c'est-à-dire, le nombre d'entités différentes par laquelle la communauté microbienne est décrite : par espèce, par genre, par famille ou encore par type fonctionnel (Tuomisto, 2012). Plus le nombre d'entités identifiées est élevé, plus la diversité de l'échantillon étudié est élevée. La structure de la communauté microbienne est également décrite par l'identité des entités qui la composent et par l'abondance de chacune de ces entités. En plus de la richesse, la diversité d'une communauté est mesurée par les équilibres d'abondance entre les individus de cette communauté. Le terme evenness est utilisé en anglais pour désigner ces équilibres d'abondance. Une communauté microbienne dominée par un ou deux individus est considérée

moins diverse qu'une communauté composée de plusieurs individus présents en même abondance. Enfin, il existe d'autres indices qui permettent d'évaluer la diversité d'une communauté microbienne. Parmi eux, les indices de Simpson et de Shannon sont les plus utilisés pour caractériser les communautés microbiennes. L'indice de Simpson (D) calcule la probabilité que deux individus sélectionnés aléatoirement dans un milieu donné soient de la même espèce. Cet indice est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Équation 1 :} \quad D = \sum \frac{\mathrm{Ni} \times (\mathrm{Ni} - 1)}{\mathrm{N} \times (\mathrm{N} - 1)}$$

Avec Ni : le nombre d'individus de l'espèce donnée et N : le nombre total d'individus.

L'indice varie entre 0 et 1 et sa valeur diminue avec la régularité de la distribution ; plus il est proche de 0 plus les chances d'obtenir des individus d'espèces différentes sont élevées.

L'indice de Shannon (H) mesure la répartition des espèces au sein de la population et cet indice est calculé par la formule suivante :

$$\text{Équation 2 :} \quad H = -\sum ((\frac{Ni}{N}) \times \log_2 (\frac{Ni}{N}))$$

Avec Ni : le nombre d'individus de l'espèce donnée et N : le nombre total d'individus.

Si tous les individus appartiennent à une seule et même espèce, H est minimal. Au contraire, l'indice est maximal quand tous les individus sont répartis de façon égale sur toutes les espèces de la population.

2.3.3. Les méthodes de caractérisation des communautés microbiennes

2.3.3.1. Les méthodes conventionnelles basées sur la mise en culture des micro-organismes

Les méthodes conventionnelles de la microbiologie culturale sont basées sur le principe d'isolement et d'identification morphologique, biochimique et/ou physiologique des micro-organismes. L'approche culturale consiste à ensemencer un échantillon sur milieu de culture devant satisfaire les exigences nutritives des micro-organismes pour favoriser la croissance cellulaire et la multiplication clonale. Après croissance sur milieu solide, l'identification des micro-organismes se fait sur des critères morphologiques qui peuvent être complétés par des analyses biochimiques. Les micro-organismes sont dénombrés par comptage d'Unités Formant Colonie, UFC, ce comptage est exprimé par gramme d'échantillon et la diversité des micro-organismes peut être décrite. De nombreuses communautés bactériennes, telles que celles de saucisses de porc (Samelis et Georgiadou, 2000), de viande de porc (Liu *et al*., 2006) ou encore de jambon sec (Losantos *et al*., 2000) ont ainsi été décrites et étudiées. Cependant, la sélection imposée par les milieux de culture (exigences nutritionnelles spécifiques, températures de croissance optimale, etc.) entraine une sous-estimation de la diversité de la communauté bactérienne. Plusieurs études ont souligné que les comptages au microscope étaient bien supérieurs aux comptages effectués en milieu solide (Amann *et al*., 1995 ; Hugenholtz *et al*., 1998). Avec l'avènement des méthodes moléculaires, il est maintenant admis que la majorité des espèces bactériennes ne sont pas cultivables en milieu de laboratoire [de 0,001 à 15 % des micro-organismes cultivables selon l'écosystème considéré (sol, microbiote intestinal, etc.), Giraffa et Neviani, 2001]. Pour la caractérisation des communautés microbiennes des aliments, cette approche culturale est peu sensible puisqu'en plus d'être sélective pour de nombreux micro-organismes, elle ne permet que de distinguer les espèces majoritaires.

2.3.3.2. Les méthodes moléculaires basées sur l'analyse des acides nucléiques

Les avancées en biologie moléculaire ont permis le développement de méthodes non culturales, basées sur la caractérisation de la communauté microbienne à partir des ADN microbiens. Ces approches reposent sur la possibilité de discriminer les individus, appartenant à des taxons différents, à partir d'un fragment d'ADN, et notamment de marqueurs moléculaires, gènes codant pour les ARN ribosomaux (ARNr) 16S (pour les bactéries) ou 28S (pour les organismes eucaryotes, tels que les levures par exemple). Quelques techniques qui ont été utilisées pour la caractérisation des communautés microbiennes des aliments peuvent être citées en exemple telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence FISH (Rohde *et al*., 2015), les techniques d'empreinte telles que l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) (Cocolin *et al*., 2001 ; Ercolini *et al*., 2006 ; Gkatzionis *et al*., 2014), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP) (Bokulich et Mills, 2012 ; Gkatzionis *et al*., 2014), les micropuces ADN (DNA microarrays) (Rasooly et Herold, 2008), les réactions de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) (Masco *et al*., 2007) ou encore le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Benson *et al*., 2014 ; Chaillou *et al*., 2015). Cette dernière technique permet une analyse plus précise des communautés microbiennes puisqu'elle est ni dépendante de la cultivabilité des bactéries, ni ciblée sur une espèce bactérienne particulière. Elle permet de dresser un inventaire détaillé de l'ensemble des espèces bactériennes présentes dans l'écosystème étudié. À l'origine, le séquençage ne pouvait se faire sur un mélange complexe de molécules d'ADN. Il fallait passer par une étape d'isolement des brins d'ADN puis par clonage dans des cellules bactériennes. La diversité microbienne pouvant être grande dans un échantillon, le nombre de clones générés ne permettait pas d'estimer précisément la diversité microbienne. Aujourd'hui, l'amélioration des techniques de séquençage permet de séquencer des fragments d'ADN sans

passer par une étape de clonage et permet de séquencer simultanément plusieurs communautés bactériennes issues de plusieurs échantillons.

2.3.3.3. Application des outils à haut-débit pour la caractérisation des communautés microbiennes

Avec les progrès des techniques de biologie moléculaire et de séquençage, les communautés microbiennes peuvent être décrites par le séquençage d'un gène spécifique (marqueurs phylogénétiques par exemple) ou par le séquençage de l'ensemble des génomes des micro-organismes, on parle alors de métagénomique. D'autres constituants peuvent être utilisés pour la caractérisation et la description des communautés microbiennes : les ARN dont l'analyse permet l'étude globale des gènes exprimés par la communauté microbienne (métatranscriptomique), l'ensemble des protéines constituant les micro-organismes (métaprotéomique) ou encore les métabolites (sucres, gras, biomolécules, etc.) produits par les micro-organismes (meta-métabolomique) (Figure 3).

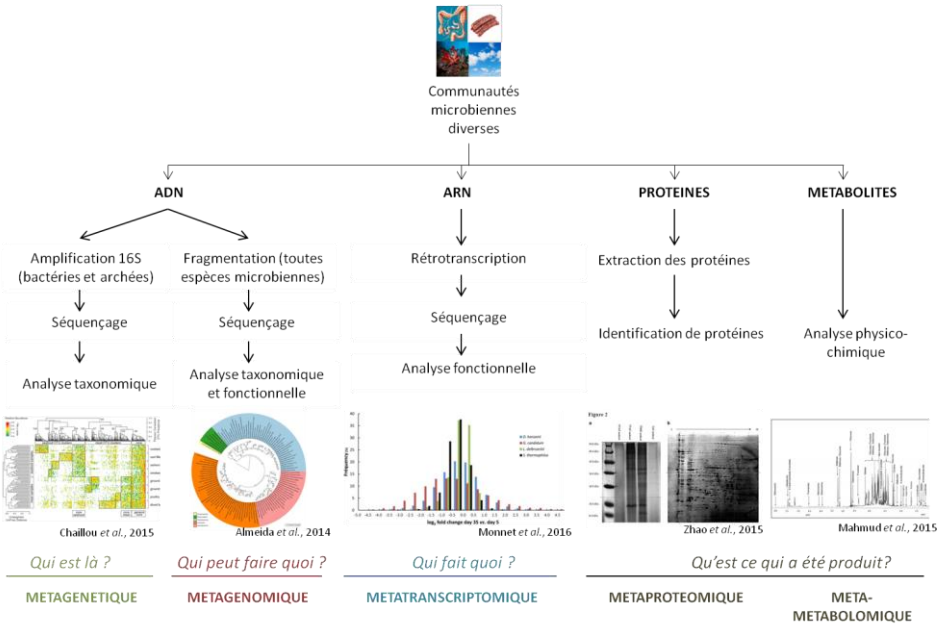


Figure 3 : les différentes approches à haut-débit utilisées pour décrire et caractériser les communautés microbiennes

Dans la suite de ce chapitre, nous focaliserons notre propos sur la caractérisation des communautés bactériennes dans les aliments par métagénétique et métatranscriptomique.

2.3.4. L'utilisation de la métagénomique pour caractériser la diversité des communautés bactériennes des aliments

Pour décrire la diversité d'une communauté bactérienne, deux approches peuvent être utilisées, mais celles-ci répondent à des objectifs différents. La première approche consiste à utiliser les propriétés phylogénétiques des gènes codant pour l'ARNr 16S pour effectuer un inventaire taxonomique des espèces présentes (métagénétique) tandis que la deuxième consiste à séquencer l'intégralité de l'ADN des génomes qui permet d'effectuer l'inventaire taxonomique, mais qui permet également d'identifier les gènes portés par la communauté microbienne (métagénomique).

2.3.4.1. La métagénétique basée sur le séquençage des gènes codants pour les ARNr 16S

Cette technique utilise notamment le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal comme marqueur de la diversité génétique. En comparant les ARNr de divers organismes bactériens, Carl Woese (1987) a pu mettre en évidence que les gènes codant pour les ARNr sont hautement conservés au sein d'organismes de la même espèce. Plus précisément, le degré de diversité des séquences de ces gènes est très faible entre les organismes d'une même espèce, mais est suffisamment élevé entre les organismes d'espèces différentes. De plus, les séquences de ces gènes ne changent que très lentement dans le temps comparées aux séquences des autres gènes. Les gènes codant pour l'ARNr 16S deviennent ainsi une horloge moléculaire pertinente pour étudier l'évolution des espèces (Woese, 1987). L'ARNr 16S est bon candidat comme marqueur de diversité génétique des communautés bactériennes pour les raisons suivantes : (1) ubiquiste chez tous les Procaryotes ; (2) sa taille

de 1 500 paires de bases permet un séquençage à faible coût ; (3) présent en de multiples copies au sein d'un génome : de 1 à 15 copies par génome bactérien (Stoddard 2015) et (4) bon compromis entre la conservation et la variabilité : présence de 8 régions hautement conservées et de 9 régions hypervariables, V1-V9 (Baker *et al*., 2003) permettant de faire la distinction entre les espèces (Van de Peer *et al*., 1996) (Figure 4) :

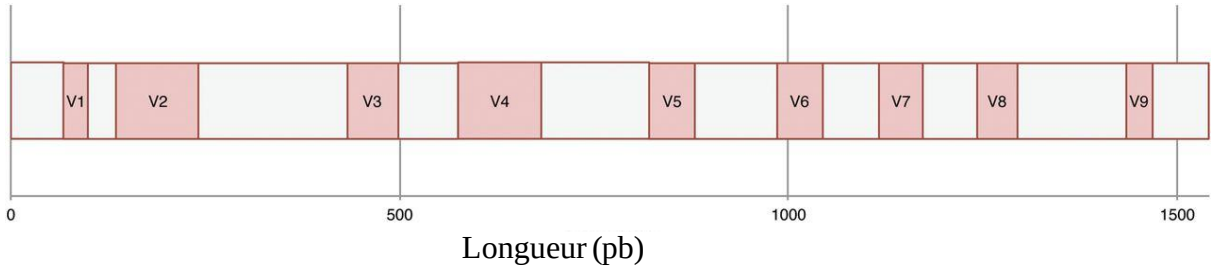


Figure 4 : représentation du gène codant pour l'ARNr 16S présentant les 9 régions hypervariables (d'après lcsciences.com)

L'utilisation de ce gène phylogénétique permet d'identifier les espèces isolées et le développement des techniques de séquençage et des outils bio-informatiques permettent d'utiliser ce gène pour caractériser une communauté bactérienne dans sa globalité (métagénétique). Toutefois, les techniques de séquençage ne permettent pas encore de séquencer en une seule fois la totalité du gène codant pour l'ARNr 16S. De plus, les 9 régions hypervariables présentent différents degrés de diversité de séquences, et aucune région hypervariable seule n'est en mesure de faire la distinction entre toutes les espèces bactériennes. Le choix de la région à amplifier est donc crucial quant au niveau de précision souhaité pour la caractérisation de la communauté bactérienne. Une étude réalisée par Kim *et al*., (2011) préconisait l'utilisation des régions V1-V3 et V1-V4 pour une meilleure identification des bactéries et de la région V1-V3 pour les *Archaea*, tandis que Yang *et al*., (2016) suggèrent que la région V4-V6 est la région la plus optimale pour distinguer les différents phyla bactériens.

Dans une étude métagénétique, l'unité de mesure taxonomique est l'OTU désignant l'Unité Taxonomique Opérationnelle (Operational Taxonomic Unit en anglais). Les OTU basées sur l'identification des gènes codant pour l'ARNr 16S permettent de définir une catégorie proche du rang taxonomique de l'espèce si le degré des similitudes est d'au moins 97 %. Ainsi, les bactéries qui présentent plus de 97 % de similarité dans leurs séquences d'ARNr 16S appartiennent au même OTU. Pour assigner une taxonomie à chaque OTU, les séquences sont comparées aux séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S disponibles dans les banques de données spécialisées telles que la base RDP (Ribosomal Data Project, Cole *et* al., 2014) ou la base SILVA (Quast *et al*., 2013). L'augmentation du nombre de séquences disponibles dans ces banques (plus de 5 millions de séquences de gènes codant pour l'ARNr 16S référencées dans la base SILVA) témoigne de l'engouement pour l'utilisation de ce marqueur moléculaire dans l'objectif d'identifier les communautés bactériennes.

L'apport de cette technique a enrichi les connaissances en écologie microbienne à tel point que certains groupes phylogénétiques entiers n'ont aucun représentant cultivable. En outre, cette approche reste descriptive quant à la caractérisation de la communauté microbienne (Figure 3), mais ne permet pas d'identifier les fonctions portées par les individus.

2.3.4.2. La métagénomique par séquençage de type *shotgun*

La deuxième approche de caractérisation d'une communauté bactérienne est la métagénomique par séquençage de type *shotgun* (Figure 3). Cette approche consiste à extraire la totalité de l'ADN microbien, de le fragmenter aléatoirement puis de séquencer l'ensemble de ces fragments. Par cette approche, il est désormais possible d'explorer simultanément deux aspects de la communauté : la description taxonomique et la potentialité de fonctions portées par cette communauté (Forde et O'Toole, 2013). Puisqu'aucune région

spécifique de l'ADN n'est ciblée, il est possible d'avoir accès à l'ensemble de la communauté microbienne (bactéries/archées, levures et moisissures) présente dans un aliment. Cependant, l'écueil de cette technique est la nécessité de disposer d'une base de données de référence suffisamment complète et exhaustive. En effet, à la suite du séquençage, les différents fragments obtenus ne peuvent pas être assemblés pour reconstituer le génome d'origine duquel ils proviennent. On procède donc à l'assemblage de fragments, souvent très courts (< 2 kb) dont on ne peut vérifier de manière sûre l'homogénéité d'origine. L'identification taxonomique est réalisée par alignement de ces fragments de génome assemblés contre des génomes de référence. Cette approche ne peut donc pas être réalisée sans la connaissance de la composition de la communauté microbienne de l'échantillon analysé. De plus, l'augmentation des données générées par cette approche nécessite de disposer d'outils informatiques performants afin de pouvoir manipuler et traiter les millions de séquences obtenues.

Alors que la métagénétique basée sur les gènes codant pour l'ARNr 16S permet de décrire la structure d'une communauté bactérienne, la métagénomique de type shotgun permet également de prédire la fonctionnalité des gènes. Cependant, elle ne permet en rien d'évaluer et de prédire l'expression des gènes.

2.3.4.3. Apports de cette approche en écologie microbienne des aliments

Dans le domaine alimentaire, les études de caractérisation des communautés microbiennes ont principalement été menées en étudiant les gènes codants pour l'ARNr 16S (revues de Ercolini, 2013 et de Kergourlay *et al*., 2015).

La première étude a été consacrée à la caractérisation de la structure et de la dynamique de la communauté bactérienne d'un produit fermenté traditionnel africain, le ben-saagla, bouillie de mil fermenté (Humblot et Guyot, 2009). Les auteurs ont caractérisé la

communauté bactérienne de ce produit et conformément à leurs attentes, cette communauté était dominée par des bactéries lactiques. Ils ont cependant mis en évidence la présence d'espèces appartenant au phylum des *Proteobacteria* et notamment des *Acetobacteraceae*, espèces bactériennes d'origine environnementale, des *Enterobacteriaceae*, des pathogènes opportunistes ainsi que des espèces de la famille des *Moraxellaceae* ou *Acetobacteraceae* occasionnellement associées à des infections humaines. Cependant, en fin de fermentation (24 heures après la fabrication), la majorité de ces espèces n'était plus détectée et les auteurs soulignent l'efficacité de la fermentation. Cette première étude souligne la faisabilité d'utiliser cette approche pour décrire les communautés bactériennes des aliments fermentés. Depuis, un grand nombre d'aliments et de boissons fermentées ont été décrits par cette approche (revue de Kergourlay *et al*., 2015) et en particulier les produits fermentés asiatiques : sushi japonais (Kiyohara *et al*., 2012), riz fermenté japonais (Sakamoto *et al*., 2011), liqueur chinoise (Li *et al*., 2011), la pâte de soja (Nam *et al*., 2012) ou encore le kéfir (Nalbantoglu *et al*., 2014). Ces études ont permis de suivre la dynamique des communautés bactériennes lors du procédé de fermentation. Le kimchi, produit emblématique de la cuisine coréenne, est l'un des produits fermentés ayant fait l'objet de nombreuses études par le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S (Jung *et al*., 2011). Les communautés bactériennes ont été suivies pendant les 30 jours de fermentation à 4 °C et les auteurs ont pu souligner que les espèces majoritaires appartenaient aux genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Weissella*, mais que chacune de ces espèces avait une dynamique différente au cours du procédé de fermentation.

Parmi d'autres produits alimentaires où des flores bactériennes d'intérêt technologique ont été utilisées lors de la fabrication, Quigley *et al*., (2012) furent les premiers à caractériser la communauté microbienne d'un fromage. Ils ont pu mettre en évidence la présence de plusieurs genres bactériens non spécifiques des communautés bactériennes de fromage tels que *Faecalibacterium*, *Prevotella* et *Helcococcus*, et pour la première fois, ils ont détecté la

présence d'Arthrobacter et *Brachybacterium* dans les fromages au lait de chèvre. Depuis cette première publication, beaucoup de travaux ont porté sur la caractérisation des communautés microbiennes de divers fromages : la mozzarella (Ercolini *et al*., 2012), du fromage polonais (Alegria *et al*., 2012), du fromage « Latin-style » (Lusk *et al*., 2012), du fromage croate (Fuka *et al*., 2013), du fromage mexicain (Aldrete-Tapia *et al*., 2014) ou encore du fromage belge (Delcenserie *et al*. 2014) pour ne citer que quelques exemples. Ces travaux avaient pour objectif de caractériser les communautés bactériennes des produits, et cette caractérisation a notamment permis d'identifier une empreinte bactérienne caractéristique des fromages à Appellation d'Origine Protégée (Fuka *et al*., 2013 ; Delcenserie *et al*., 2014 ; Aldrete-Tapia *et al*., 2014). Plus récemment, une étude a été menée pour caractériser la communauté microbienne de divers fromages, en utilisant l'approche shotgun (Almeida *et al*., 2014). Cette approche nécessitant l'utilisation d'une base de génomes microbiens afin de pouvoir identifier les micro-organismes, les auteurs ont construit une base de génomes bactériens spécifiques des fromages. Pour construire cette base, ils ont répertorié l'ensemble des espèces microbiennes identifiées dans les fromages puis l'ensemble des souches identifiées ont été séquencées. Les génomes ainsi séquencés ont donc constitué la base de référence. Cependant, les auteurs ont mis en évidence que 20 % des lectures obtenues étaient toujours non caractérisées, c'est-à-dire non assignées à des espèces connues. Au-delà de la limite qui peut-être imposée par la création du catalogue de génomes de référence, Wolfe *et al*., (2014) ont montré que la communauté microbienne de la croûte de fromage est composée d'un noyau principal bactérien (14 espèces) et levurien (10 genres) complété par un écosystème sous-dominant, spécifique selon les fromages, impliqué dans leur affinage et leur maturation. De plus, O'Sullivan *et al*., (2015) ont montré que (1) les fromages fabriqués en début de journée avaient une diversité bactérienne plus élevée que ceux produits en fin de journée et que (2) cette diversité était persistante au cours de l'affinage des produits. Ceci est une préoccupation

majeure pour les acteurs de l'industrie des fromages qui souhaitent mieux maîtriser la qualité des fromages au lait cru. Pour les nouvelles espèces jusqu'alors jamais identifiées dans les fromages, leur implication dans la définition des caractères organoleptiques des fromages reste inconnue, tout comme leur innocuité.

Les techniques de séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S ont également été utilisées pour la caractérisation des communautés bactériennes des produits carnés non fermentés et principalement les produits carnés altérés avec trois objectifs principaux (1) caractériser la diversité et la structure des communautés bactériennes des produits altérés (Benson *et al*., 2014 ; Pothakos *et al*., 2014 ; Chaillou *et al*., 2015), (2) identifier l'origine des contaminations par les espèces présentes (De Filippis *et al*., 2013b ; Hultman *et al*., 2015 ; Pisacane *et al*., 2015 ; Mann *et al*., 2016) et (3) identifier l'influence de paramètres environnementaux sur la croissance de ces espèces (Doulgeraki *et al*., 2012 ; Säde *et al*., 2013 ; Miller *et al*., 2015 ; Nieminen *et al*., 2015). Ces études ont été présentées dans le paragraphe 2.2.3.2.

À ce jour, il est encore difficile d'accéder à l'ensemble de la communauté bactérienne. Les techniques de séquençage permettent de quantifier l'abondance des espèces de manière relative et d'identifier les espèces minoritaires jusqu'à 10 000 fois moins présentes que les espèces dominantes. Cependant, dans une communauté où une ou plusieurs espèces sont largement majoritaires (lors de l'utilisation de flores technologiques par exemple), cela pose des limites à l'identification des espèces minoritaires. De plus, cette technique peut devenir limitante à la caractérisation des communautés bactériennes quand les espèces majoritaires sont peu connues ou que leurs abondances sont largement sous-estimées.

Cette approche représente une avancée majeure dans la description des communautés bactériennes des aliments. L'ensemble de ces travaux à ce jour réalisé a permis de révéler que

les communautés bactériennes des aliments étaient bien plus complexes que ce qui était connu, et que les bactéries sous-dominantes peuvent jouer un rôle crucial dans la définition organoleptique des produits ou au contraire être impliquées dans les phénomènes d'altération de la viande. Cependant, ces études restent à un niveau descriptif et ne permettent pas de comprendre le fonctionnement et les interactions de la communauté bactérienne.

2.3.5. L'utilisation de la métatranscriptomique pour mettre en évidence les informations fonctionnelles portées par la communauté bactérienne des aliments

2.3.5.1. Principe

La métatranscriptomique est une démarche qui vise à extraire l'ensemble des ARN *in situ* puis à séquencer les ADN complémentaires (ADNc) issus de la rétrotranscription des ARN (Figure 3). Cette approche permet de mesurer simultanément, à un temps t, les profils d'expression génique de la communauté bactérienne. Cette stratégie est généralement menée en aval de la métagénomique, car elle nécessite l'acquisition préalable de références métagénomiques pour identifier les gènes et les fonctions exprimés. La mise en œuvre de la méthode ainsi que la stratégie d'analyse seront exhaustivement présentées dans le chapitre des méthodes.

2.3.5.2. Apports de cette approche pour approfondir la connaissance des communautés microbiennes des aliments

L'analyse des transcrits des génomes est couramment appliquée aux communautés microbiennes des sols (Bailly *et al*., 2007 ; Urich *et al*., 2008 ; Damon *et al*., 2012 ; Bremges *et al*., 2015), des environnements marins (Gilbert *et al*., 2008 ; Marchetti *et al*., 2012 ; Mason *et al*., 2012 ; Kopf *et al*., 2015) ou encore du microbiote intestinal humain (Booijink *et al*., 2010 ; Qin *et al*., 2010 ; Franzosa *et al*., 2014 ; Leimena *et al*., 2013). À ce jour, il

existe quelques études de métranscriptomique appliquées aux communautés microbiennes alimentaires.

Par des travaux précédents, Jung *et al*., (2011) avait identifié que la communauté microbienne du kimchi était dominée par 6 bactéries lactiques : *L. mesenteroides*, *L. sakei*, *W. koreensis*, *L. gelidum*, *L. carnosum* et *L. gasicomitatum*. Pour chaque espèce, ils ont utilisé les séquences d'un génome représentatif de l'espèce afin d'étudier le profil d'expression génique lors de la fermentation du kimchi pendant 29 jours (Jung *et al*., 2013). Ils ont ainsi pu mettre en évidence des changements d'expression de ces bactéries lors de la fermentation : *L. mesenteroides* était le plus actif au début de la fermentation alors que l'expression des gènes de *L. sakei* et de *W. koreensis* était élevée en fin de fermentation. De nombreux gènes impliqués dans le transport et l'hydrolyse du glucose ainsi que dans la fermentation du lactate étaient fortement exprimés. Cette étude a également permis d'identifier plus finement l'implication et le rôle de chacune de ces espèces dans la fermentation du kimchi.

Toujours dans le domaine des produits fermentés, plusieurs études ont porté sur l'expression génique des communautés microbiennes lors de la maturation du fromage. Ainsi, Lessard *et al*., (2014) ont exploré les profils d'expression de *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti*, deux champignons majoritaires, lors de l'affinage de différents fromages (durant 77 jours). Ils ont ainsi mis en évidence que les activités lipolytiques et protéolytiques, contributeurs majoritaires aux caractéristiques organoleptiques des fromages, avaient lieu durant les deux premières semaines d'affinage. Dugat-Bony *et al*., (2015) ont également suivi l'expression de la flore technologique, *Lactococcus lactis*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* et *Geotrichum candidum* et la flore d'affinage, *Corynebacterium casei*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Staphylococcus equorum* et *H. alvei*, durant l'affinage (21 jours) de fromages à croûte lavée.

Par cette approche, ils ont pu mettre en évidence l'implication de chacune de ces espèces dans le développement des propriétés organoleptiques des fromages, en reliant les mesures biochimiques réalisées (dosages du lactate, des acides aminés libres ou encore mesures des indices de lipolyse et de protéolyse) avec les fonctions exprimées par les espèces microbiennes. Contrairement aux activités métaboliques identifiées lors de l'affinage des camemberts (Lessard *et al*., 2014), les activités lipolytiques et protéolytiques des flores technologiques (*S. thermophilus, L. delbrueckii, B. aurantiacum, D. hansenii,* et *G. candidum*) utilisées lors de la fabrication de Reblochon (Monnet *et al*., 2016) sont plus importantes en fin d'affinage (35 jours). Les auteurs de cette étude ont également montré que l'expression de gènes de *G. candidum* était stable tout au long de l'affinage alors que celle de *D. hansenii* augmentait et celle de *S. thermophilus* diminuait.

Ces travaux différents caractérisent des activités métaboliques mises en œuvre lors de la maturation des fromages et permettent d'identifier précisément l'implication potentielle de chaque espèce dans la transformation des produits lors de l'affinage des produits. Le suivi de l'affinage des différents fromages a été réalisé sur les flores technologiques utilisées lors de la fabrication des fromages. Or, de nombreuses études soulignent qu'en plus des flores technologiques utilisées, les fromages peuvent abriter une communauté microbienne diversifiée qui peut atteindre plus de 10^{10} cellules.g^{-1} (Feurer *et al*., 2004 ; Rea *et al*., 2007 ; Almeida *et al*., 2014 ; Montel *et al*., 2014). L'ensemble de cette communauté, en interaction avec les flores technologiques, est susceptible de participer au développement des caractéristiques organoleptiques. De Filippis *et al*., (2016) ont caractérisé l'expression des gènes de l'ensemble de la communauté microbienne lors de l'affinage d'un fromage à pâte filée italien, le Caciocavallo Silano. Les auteurs ont mis en évidence que l'augmentation de la température d'affinage permettait d'augmenter l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse et la protéolyse. Cette étude souligne l'intérêt d'étudier la réponse d'expression de

la communauté microbienne face à des variations de facteurs environnementaux qui peuvent orienter l'affinage et donc moduler la qualité organoleptique des fromages.

À ce jour, il n'existe pas d'études publiées qui caractérisent l'expression des gènes des communautés microbiennes identifiées des produits carnés. Cette démarche de RNAseq permettrait, entre autre, d'identifier les mécanismes d'adaptation de la communauté microbienne à l'environnement dans lequel elle se trouve, mais également d'identifier les gènes exprimés par la communauté microbienne impliquée dans l'altération de ces produits.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS D'ÉTUDE

3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS D'ÉTUDE

La revue bibliographique présentée dans le chapitre 2. a permis de souligner l'importance de l'utilisation de facteurs abiotiques pour maîtriser le développement des communautés bactériennes (altérantes et pathogènes) présentes dans les produits carnés. Le sel, historiquement utilisé comme conservateur, est un moyen de lutte efficace, cependant les recommandations nutritionnelles visent à réduire sa teneur dans les produits alimentaires. Cette réduction suggère le risque accru de développement des micro-organismes indésirables. Les objectifs de ce travail de thèse ont été de mesurer les impacts de la réduction de sel sur l'évolution et la nature de l'altération et de corréler ces évolutions à l'impact obtenu sur les communautés bactériennes (altérantes et pathogènes) des chipolatas de porc crues. De manière plus précise, nous avons souhaité répondre à trois problématiques :

(1) Quelle est l'influence de la réduction de la teneur en sel sur l'altération des chipolatas et quel est le réel impact de cette réduction sur la diversité bactérienne des chipolatas ?

Tout d'abord, nous avons caractérisé et mesuré l'altération des chipolatas par des méthodes sensorielles et physico-chimiques. Ensuite, nous avons quantifié et analysé la diversité bactérienne par plusieurs méthodologies, dont le séquençage d'amplicons de l'ARNr 16S. Ces travaux sont présentés dans la partie 1 du chapitre des résultats et ont été valorisés par une publication (Fougy *et al*., 2016).

(2) Comment la réduction de la teneur en sel influe-t-elle sur les fonctions exprimées par l'écosystème bactérien associé à l'altération des chipolatas ?

Une analyse métatranscriptomique de l'écosystème bactérien des chipolatas a été menée afin de mesurer la réponse fonctionnelle de l'écosystème bactérien à la baisse de sel. Ces travaux sont présentés dans la partie 2 du chapitre des résultats.

(3) Quelle est l'influence de la réduction de la teneur en sel sur la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium et dans quelle mesure l'expression des gènes du pathogène peut être affectée par cette réduction de la teneur en sel ?

La croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans les chipolatas, a été suivie dans les chipolatas selon les deux teneurs en sel et nous avons tenté d'extraire les ARN bactériens afin d'étudier l'expression génique du pathogène après croissance dans les chipolatas. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 3 des résultats.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1. Préparation des chipolatas et du matériel biologique

4.1.1. Chipolatas de porc

4.1.1.1. Fabrication des chipolatas

Dans la suite de ce manuscrit, le terme « viande » sera utilisé pour désigner la matière première brute utilisée pour la fabrication des chipolatas. Le terme « mêlée de chipolata » désigne le mélange de viande hachée avec les épices mais non embossé et le terme « chipolatas » désigne le produit fini, c'est-à-dire la mêlée de chipolata embossée en boyau.

Selon le Code des Usages de la Charcuterie, les chipolatas sont « des préparations obtenues par broyage et mélange de maigre et de gras […] auxquelles ont été ajoutés les seuls ingrédients et additifs autorisés ». Dans le cadre de cette étude, les chipolatas ont été réalisées manuellement et leur fabrication comportait 5 étapes principales :

– la matière première (50 % de poitrine de porc dégraissée et découennée et 50 % d'épaule de porc) a été achetée auprès du grossiste ABG Socopa (Strasbourg, France) puis, au sein du hall technologique du groupe Solina (Strasbourg, France), les viandes ont été parées puis coupées grossièrement au couteau.

– le mélange d'épices utilisé est celui classiquement employé dans l'industrie de charcuterie pour la fabrication des chipolatas. Ce mélange, ajouté à hauteur de 1,2 % m/m de viande, est composé d'un mélange d'épices (poivre noir, muscade, ail et piment fort) ainsi que divers ingrédients (sirop de glucose [0,9 %, m/m] ; dextrose [0,052 %, m/m] ; acide ascorbique [0,040 %, m/m] ; ascorbate de sodium [0,015 %, m/m] et carmin [0,0028 %, m/m]). En 2013, la teneur moyenne en sodium des chipolatas fabriquées et commercialisées en France était de 855 ± 98 mg/100 g soit l'équivalent de 2,1 % (m/m) de NaCl (Ciqual, 2013). Ainsi, dans cette

étude, le chlorure de sodium a été ajouté selon la condition expérimentale testée, 2,0 % (m/m) et 1,5 % (m/m) de NaCl, soit une réduction de 25% de NaCl. Il s'agit de NaCl obtenu par dissolution de sel gemme (sel fossile extrait des mines). Afin de mettre en évidence l'impact du taux de chlorure de sodium sur le phénomène d'altération, aucun conservateur ni autre source de sodium n'a été ajouté mis à part l'ascorbate de sodium, utilisé en tant qu'antioxydant, considéré comme quantitativement négligeable par rapport à la teneur en sodium apportée par le sel (NaCl). Dans la suite de ce manuscrit, le terme sel sera utilisé pour désigner le chlorure de sodium.

– le mélange viande/ingrédients a ensuite été haché grossièrement dans un cutter (Seydelmann, K20, Ras 90188-1) pendant 30 s, laissant visible les différents constituants du produit.

– la mêlée de chipolata obtenue a ensuite été embossée dans un boyau naturel (menu de mouton de 24 à 26 mm de diamètre) à l'aide d'un poussoir (Mod 7/V, Tre spade); les boyaux étant préalablement dessalés par quatre rinçages dans des bains d'eau.

– enfin, les chipolatas ont été conditionnées (MBT-18, Multivac) en sachets PA/PE (polyamide et polyéthylène, 200 mm x 300 mm, 604131, Cenpac) sous vide (VPA) ou sous atmosphère modifiée (MAP - mélange de 50 % de CO_2 et 50 % de N_2, Airproducts)

4.1.1.2. Irradiation de la mêlée de chipolata

Cette technique consiste à exposer la mêlée de chipolata à des rayonnements ionisants (rayonnement gamma, rayons X de faibles énergies ou faisceaux d'électrons) afin de décontaminer la matrice. La dose d'irradiation appliquée, en gray (Gy), est mesurée post-traitement par le laboratoire de dosimétrie d'Aérial.

La mêlée de chipolata a été fabriquée comme indiqué précédemment, mais celle-ci n'a pas été embossée. La mêlée a été conditionnée sous vide, par plaque de 0,5 cm d'épaisseur et

a été irradiée par faisceaux d'électrons à 8 kGy (BGS, Beta- Gamma-Service GmbH, Karlsruhe, Allemagne) sous forme congelée afin de limiter les éventuels effets secondaires de type oxydatifs en raison de la présence de matière grasse. La mêlée de chipolata a été ensuite manipulée et utilisée en conditions stériles afin d'éviter tous risques de contamination lors de la manipulation des échantillons.

4.1.1.3. Dosage de la teneur en sodium

Pour valider les quantités de NaCl ajoutées pour chaque fabrication, la teneur en sodium a été dosée par photométrie de flamme. Cette méthode repose sur le fait qu'une partie des ions soumis à la chaleur de la flamme passent dans un état excité. Le retour à l'état fondamental se fait avec des émissions de rayonnements et l'intensité de la lumière émise est proportionnelle au nombre d'atomes revenant à l'état fondamental et donc proportionnelle à la concentration de l'ion dans l'échantillon. Pour convertir la teneur en Na en quantité de sel (chlorure de sodium), on utilise la formule suivante :

$$\text{Équation 3 : } m_{NaCl} = \left(\frac{MM_{NaCl}}{MM_{Na}}\right) \times m_{Na}$$

$$\text{Équation 4 : } m_{NaCl} = 2{,}54 \times m_{Na}$$

où m_{NaCl} = masse de NaCl, m_{Na}= la masse de l'ion sodium mesurée, MM_{NaCl} = la masse molaire de chlorure du sodium (58,44 $g.mol^{-1}$), MM_{Na}= la masse molaire de l'ion Na (23 $g.mol^{-1}$).

Pour chaque lot de fabrication, 10 g d'échantillon ont été envoyés au laboratoire Larebron (Illkirch, France) effectuant ce type de dosage.

4.1.2. Souche et inoculation de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata

4.1.2.1. Préparation des cultures

La souche de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium (*Salmonella* ser. Typhimurium) utilisée au cours de cette étude provient de la collection d'Aérial, isolée en 2012 à partir de saucisses de porc maison (MH. Desmonts, communication personnelle). Cette souche a été inoculée après la réalisation de trois cultures successives afin d'obtenir une population physiologique homogène et un taux de population d'environ 10^9 UFC.mL^{-1}.

Ces 3 cultures successives de *Salmonella* ser. Typhimurium ont été réalisées dans du milieu BHI (Bouillon Cœur Cervelle) liquide (CM1135, Oxoid). La première culture a été réalisée par introduction d'une cryobille (conservée dans du glycérol à - 80 °C) dans le bouillon de culture puis a été incubée à 37 °C pendant 16 h sans agitation en microaérophilie Le taux de population à l'issue de la première culture est d'environ $1{,}7.10^9$ UFC.mL^{-1} (mesuré par dénombrements sur milieu de culture solide, Trypton Soy Agar, TSA, PO5012A, Oxoid). La deuxième culture a été réalisée à partir d'une dilution à 10^{-7} de la première culture et a été incubée à 37 °C pendant 8 h (taux de population à l'issue de la deuxième culture : ~$1{,}2.10^9$ UFC.mL^{-1}). La troisième culture représentait une dilution à 10^{-1} de la deuxième culture incubée à 8 °C pendant 7 jours afin d'adapter la souche à la température de conservation de l'étude (taux de population à l'issue de la troisième culture : ~$1{,}5.10^9$ UFC.mL^{-1}).

4.1.2.2. Observation et dénombrement de *Salmonella* ser. Typhimurium par microscopie à épifluorescence

La technique DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) est une méthode d'observation et de dénombrement de bactéries dans un milieu liquide qui utilise la filtration sur membrane et la microscopie en épifluorescence (Pettipher *et al*., 1983).

Pour quantifier les cellules dans la troisième culture de *Salmonella* ser. Typhimurium, celle-ci a été diluée au 1/10 000, puis 2 mL de cette dilution ont été filtrés sur la membrane en polycarbonate (0,4 µm, 25 mm de diamètre, Whatman). Les bactéries ont été colorées par ajout de 1 mL d'acridine orange (14281, Merck), laissé en contact pendant 3 min. La membrane a ensuite été rincée à l'éthanol, séchée puis montée entre lame et lamelle. L'observation a été faite à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Zeiss Axisscope A1, longueur d'onde : 490 nm et rémission 510 nm) et le dénombrement a été effectué par comptage des bactéries viables (colorées en orange) dans 10 champs de visualisation. La quantification de la suspension bactérienne a ensuite été déterminée par :

Équation 5 : Nombre d'UFC.mL^{-1} = nombre de bactéries moyen par champ $\times$FM $\times \dfrac{1}{\text{dilution}}$

Avec FM, facteur multiplicatif pour le microscope utilisé :

Équation 6 : $FM = \dfrac{\text{surface de la membrane (mm}^2)}{\text{surface d'un champ de visualisation (mm}^2) \times V}$; avec V : le volume de suspension bactérienne filtrée

$$FM = \frac{(\Pi \times R^2)_{membrane}}{(\Pi \times R^2)_{champ} \times V}$$; avec R =12,5 mm et objectif : x 100

$$FM = \frac{(12{,}5)^2}{(12{,}5/100)^2 \times 2} = 5\,000$$

La 3e culture a également été dénombrée sur milieu sélectif, Iris *Salmonella*® (BM16108, Biokar) et sur milieu nutritif TSA (P05012A, Oxoid) (cf. 4.2.3). La concentration exacte de la culture a pu ainsi être déterminée.

4.1.2.3. Inoculation dans la mêlée de chipolata

Le taux d'inoculation visé de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata était de 10^4 UFC.g^{-1}. À partir de la 3e culture quantifiée par DEFT, une dilution appropriée dans une solution de tryptone et de sel a été réalisée puis inoculée dans 25 g de mêlée de chipolatas irradiée.

4.1.3. Plans expérimentaux

4.1.3.1. Étude du phénomène d'altération

L'altération des chipolatas et la caractérisation de l'écosystème associé à ce phénomène ont été décrites après 21 jours de stockage à 8 °C. Un plan expérimental à 4 conditions a été construit (Figure 5) :

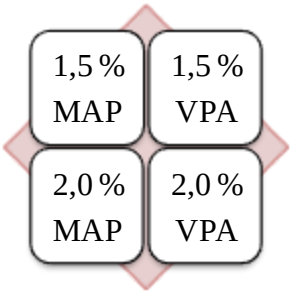


Figure 5 : plan expérimental à 4 conditions pour l'analyse de l'altération

Avec 1,5 % = 1,5 % de NaCl ; 2,0 % = 2,0 % de NaCl (soit une réduction de 25 % de NaCl) ; MAP = atmosphère modifiée ; VPA= sous vide

Les chipolatas ont été fabriquées avec deux teneurs en NaCl : 1,5 et 2,0 % (m/m). Environ 200 g de saucisses (correspondant à une saucisse unique) ont été conditionnés en sachets PA/PE, soit sous atmosphère modifiée, mélange de 50 % de CO_2 et de 50 % de N_2, soit sous vide. Pour chaque condition expérimentale, 4 échantillons ont été fabriqués, 3 étant destinés aux analyses sensorielles, physico-chimiques et microbiologiques et 1 étant destiné aux analyses moléculaires de la diversité bactérienne. Les 16 échantillons (4 conditions x 4 échantillons) ont été stockés à 8 °C pendant 21 jours. Afin d'évaluer la variabilité microbiologique de la viande crue, 10 lots indépendants ont été réalisés, ce qui représente un pool total de 160 échantillons. Pour chacun des lots et pour chacune des conditions expérimentales, des échantillons témoins ont été immédiatement (le jour de fabrication, T_0) placés à - 20 °C.

4.1.3.2. Cinétique de croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata

Contrairement au protocole décrit précédemment, le challenge-test de suivi de croissance a été réalisé directement dans la mêlée de chipolata paucimicrobienne irradiée, dépourvue de toute flore microbienne naturellement présente. Néanmoins, le plan expérimental a été construit de manière identique (Figure 5) : deux teneurs en sel et deux types de conditionnement.

Afin d'éviter tout risque de contamination lors de la manipulation des échantillons, l'inoculation de *Salmonella* ser. Typhimurium a été effectuée dans la mêlée de chipolatas non embossée. Pour chacune des deux teneurs en sel, *Salmonella* ser. Typhimurium a été inoculée dans 25 g de mêlée, à hauteur de 10^4 UFC.g^{-1}. Les échantillons ont ensuite été conditionnés en sachets PA/PE soit sous atmosphère modifiée soit sous vide. Pour chaque condition expérimentale, 4 échantillons ont été fabriqués, 3 étant destinés aux analyses physico-

chimiques et microbiologiques et 1 étant destiné aux analyses moléculaires. Les 16 échantillons (4 conditions x 4 répétitions) ont été conservés à 8 °C pendant 5 jours avec une rupture de la chaîne de froid pendant 18 h à 20 °C au 2e jour de conservation. Des échantillons non inoculés avec le pathogène ont été fabriqués et conservés dans les mêmes conditions pour les suivis physico-chimiques de la matrice.

4.2. Analyses sensorielles, physico-chimiques et microbiologiques

4.2.1. Caractérisation sensorielle de l'altération des chipolatas

Les caractéristiques sensorielles de l'altération des chipolatas ont été décrites après 21 jours de stockage à 8 °C (T_a). Un jury expert composé de quatre personnes (ces quatre personnes étaient les mêmes à chaque expérimentation) a évalué les changements d'aspect et d'odeurs en comparant les chipolatas de chaque condition à leur témoin respectif (échantillons conservés à - 20 °C pendant 21 jours). Pour éviter d'influencer les juges, les 12 échantillons (3 répétitions x 4 conditions) ont été rendus anonymes.

Critères visuels : avant ouverture des sachets, l'aspect des chipolatas altérées a été décrit en les comparant aux témoins. La description de la couleur a été confirmée par mesures chromamétriques (cf. paragraphe 4.2.2). La présence d'exsudat ainsi que la présence de gonflements (de l'emballage ou du boyau) ont été décrites et la production éventuelle de gaz a été confirmée par mesure de l'atmosphère (cf. paragraphe 4.2.2).

Critères olfactifs : immédiatement après l'ouverture des sachets, les odeurs senties ont été décrites par des termes sensoriels librement choisis par les membres du jury, puis ces termes ont été regroupés en champs lexicaux.

Le jury a ensuite attribué, par consensus, une note unique d'intensité d'altération sur une échelle de 1 (peu altéré) à 5 (fortement altéré) pour chacune des 4 conditions, 0 étant attribué aux échantillons témoins non altérés. Cette note caractérise l'intensité générale de l'échantillon altéré, et non l'intensité des odeurs identifiées. L'intensité d'altération pour chacune des 4 conditions a été représentée sous forme de violin-plots construits avec le package ggplot2 du logiciel R, version 1.0.1 (Wickham *et al*., 2013).

4.2.2. Mesures physico-chimiques

Pour chaque échantillon conditionné sous atmosphère modifiée, deux mesures d'O_2 et de CO_2 ont été réalisées à l'aide d'un analyseur d'atmosphère (PAK12P, ABISS) : la première mesure a été prise un jour après la mise sous atmosphère afin de prendre en compte l'absorption de CO_2 par la viande et la seconde mesure a été prise après 21 jours de stockage, au T_a. Les taux de CO_2 et d'O_2 résiduel dans l'emballage ont été mesurés juste avant l'ouverture des sachets pour l'analyse olfactive.

Les couleurs peuvent être perçues différemment selon les individus et selon l'exposition du produit décrit. La *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) a donc défini des standards permettant de définir une couleur dans l'espace couleur L*a*b*, dans lequel une couleur est repérée par trois valeurs (Figure 6) :

- **L***, la luminosité, exprimée en pourcentage (de 0 pour le noir à 100 % pour le blanc)
- **a*** et **b***, deux gammes de couleur allant respectivement du vert au rouge et du bleu au jaune avec des valeurs allant de - 120 à + 120.

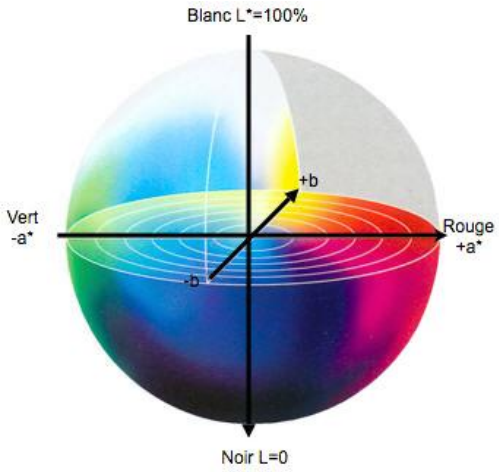


Figure 6 : espace couleur L*a*b*

Pour pallier l'hétérogénéité de la matrice (présence de morceaux de gras et de viande), 5 mesures pour chacun des 12 échantillons ont été réalisées à la surface externe des chipolatas à l'aide d'un chromamètre (CR100, Minolta). Ces mesures ont également été prises sur les échantillons témoins non altérés et les résultats sont exprimés comme la différence entre l'échantillon analysé et le témoin.

L'exsudat provient de la libération d'eau du produit qui apparait au cours de la conservation des produits, par diminution du pouvoir de rétention d'eau. Pour chaque échantillon, l'exsudat libéré a été pesé et la perte d'exsudat a été exprimée en pourcentage du poids initial de l'échantillon.

Pour chaque échantillon, le pH a été mesuré (pH 213, Hanna Instruments) dans 10 g de chipolatas homogénéisés dans 10 mL d'eau distillée, selon la norme internationale ISO 2917 : 1999.

Enfin, l'analyse en composantes principales réalisée avec le logiciel XLSTAT (version 2015.2.03) a permis de discriminer les échantillons selon les conditions expérimentales testées (teneur en sel et type de conditionnement).

4.2.3. Numérations microbiologiques sur milieux de culture solides

Le dénombrement des bactéries cultivables après 21 jours de conservation a été réalisé par numération des colonies sur milieux de culture solide. Les échantillons ont été dilués au 1/4 dans de l'Eau Peptonée Tamponnée, EPT (CM0509B, Oxoid) à partir de 25 g de chipolatas ou de mêlée de chipolata pour le dénombrement de *Salmonella* ser. Typhimurium. Des dilutions décimales adaptées ont été réalisées et étalées sur milieu gélosé. Ces dernières ont été incubées dans des conditions temps/température adaptées à l'espèce ou groupe bactérien à dénombrer (Tableau 5).

Tableau 5 : milieux de culture et conditions d'incubation pour la numération des bactéries viables

Milieu de culture	**Type de milieu**	**Conditions d'incubation**	**Espèce/groupes bactériens visés**	**Type de colonie attendu/compté**
TSA (gélose trypticase soja)	Non sélectif	30 °C pendant 72 h, aérobie	Flore aérobie	Toutes les colonies
MRS pH 5,7 [de Man, Rogosa et Sharpe, (CM0361, Oxoid)]	Sélectif	30 °C pendant 48 h, aérobie	Flore lactique mésophile	Colonies blanches
IRIS *Salmonella*	Sélectif	37 °C pendant 24 h, aérobie	*Salmonella* spp.	Colonies violettes

4.3. Techniques de biologie moléculaire

4.3.1. Extraction des bactéries à partir des chipolatas

Les bactéries sont extraites des chipolatas par trois centrifugations successives selon le protocole décrit par (Chaillou *et al*., 2015). Ces centrifugations permettent (1) d'éliminer les débris de chipolatas, (2) d'extraire les bactéries du broyat et (3) de rincer le culot bactérien.

Dix grammes de chipolatas, placés dans un sachet à filtre (140811, BagPage®) et additionnés de 40 mL d'eau ultrapure stérile contenant 1 % (v/v) de Tween 80 (278630010, Acros Organics), ont été homogénéisés à l'aide d'un Stomacher (AESAP1064, AES). Trente-deux millilitres du broyat ont été prélevés et centrifugés (5804R, Eppendorf) à 500 x *g* pendant 3 min à 4 °C. Après centrifugation, 25 mL de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube et centrifugés à 3000 x *g* pendant 5 min à 4 °C. Après élimination du surnageant, le culot bactérien a été rincé dans 1 mL d'eau stérile ultrapure, centrifugé à 3000 x *g* pendant 3 min à 4 °C. Les culots bactériens ont été conservés à - 80 °C.

4.3.2. Extraction et contrôle des acides nucléiques

4.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique bactérien total

L'ADN génomique bactérien total a été purifié à l'aide du kit d'extraction Nucleospin Tissue (740952, Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur.

Brièvement, le culot bactérien a été remis en suspension dans 180 µL de la solution T1 du kit, supplémentée avec 20 $mg.mL^{-1}$ de lysozyme (62970**,** Fulka). La prélyse a été effectuée à 37 °C pendant 60 min pour dégrader les parois bactériennes. Après ajout de 300 mg de billes de verre (0,1 mm de diamètre, 079052, Dutscher) dans cette suspension, les cellules bactériennes ont été lysées par 3 passages de 30 s sur un broyeur (IKA1, Dustcher) en laissant

les tubes 5 min dans la glace entre chaque passage. La lyse a été poursuivie par l'ajout de 20 mg.µL^{-1} de protéinase K (P8107S, Biolabs) et 1 mg.mL^{-1} de RNase A (10109142001, Roche) a été ajouté pour éliminer toute trace d'ARN résiduel. Le mélange réactionnel a été incubé à 56 °C jusqu'à ce que la lyse soit complète (environ 30 min). À ce lysat, ont été ajoutés 300 µL de tampon B3 du kit (sels chaotropiques), le mélange a été incubé à 70 °C pendant 10 min. Les billes et les débris cellulaires ont été éliminés après centrifugation à 10 000 x *g* pendant 3 min. La préparation à la fixation des ADN sur la colonne de silice a été réalisée par ajout de 210 µL d'éthanol. Le lysat a ensuite été transféré sur la colonne d'extraction et centrifugé à 11 000 x *g* pendant 1 min afin de fixer les ADN à la membrane de silice. La membrane a ensuite été lavée en ajoutant 500 µL de tampon BW du kit puis 600 µL de tampon B5 du kit dans les colonnes. L'ensemble a été centrifugé à 11 000 x *g* pendant 1 min après chacun des deux lavages. Les ADN ont été élués dans 100 µL de tampon d'élution BE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) préchauffé à 70 °C puis centrifugés à 11 000 x *g* pendant 1 min. Les solutions d'ADN ont été conservées à -20 °C.

4.3.2.2. Extraction des ARN bactériens totaux

Les ARN totaux ont été extraits des bactéries par la méthode au trizol et phénol/chloroforme. Cette méthode utilise la solubilité différentielle des molécules [acides nucléiques/contaminants (protéines, etc.)] afin d'extraire les ARN bactériens en bonne quantité et de bonne qualité. L'ensemble des étapes d'extraction d'ARN est réalisé à 4 °C (centrifugation et conservation des solutions d'extraction) ou dans la glace lors des transferts dans les tubes. Cette extraction comporte quatre étapes : (1) une lyse mécanique réalisée dans du phénol/chloroforme, (2) une séparation des ARN au trizol et chloroforme, (3) une précipitation des ARN à l'isopropanol et (4) un lavage des ARN à l'éthanol.

– Lyse cellulaire : le culot bactérien (extrait à partir de 25 g de viande par la méthode décrite en 4.3.1) a été repris dans 400 µL de tampon TE (Tris 10 mM pH 7 ; EDTA 0,5 M pH 8, Sigma). La suspension bactérienne a ensuite été transférée dans un tube à vis contenant 0,6 g de billes de verre (0,1 mm, 079052, Dutscher) et 500 µL de phénol : chloroforme 5 : 1, pH 4,7 (P1944, Sigma) permettant la solubilisation des membranes cellulaires. La lyse mécanique a été effectuée par deux passages de 45 s à vitesse 6,5 $m.s^{-1}$ dans un casseur de cellules Fastprep (FP120, MPBiomedicals) en laissant les tubes 2 min dans la glace entre chaque passage.

– Séparation des ARN : Après centrifugation à 10 000 x *g* pendant 10 min à 4 °C, la phase aqueuse supérieure contenant les ARN a été prélevée, 1,3 mL de Tri Reagent® (TR118, Euromedex) ont été ajoutés. Après avoir mélangé précautionneusement, ce mélange a été incubé 5 min à température ambiante pour dénaturer les protéines résiduelles. La purification des ARN a été réalisée en ajoutant 350 µL de chloroforme (22711.290, VWR) à la suspension précédente et en incubant 3 min à température ambiante afin de se débarrasser de toute trace de phénol résiduel.

– Précipitation des ARN : Après centrifugation à 16 000 x *g* pendant 15 min à 4 °C, le surnageant (~1 mL) contenant les ARN a été transféré dans un tube contenant 800 µL d'isopropanol (34965, Fluka) et les ARN ont été précipités en agitant vigoureusement à la main pendant 30 s. Après centrifugation à 16 000 x *g* pendant 10 min à 4 °C, le surnageant a été éliminé, le culot d'ARN pouvait être visible au fond du tube.

– Lavage des ARN : le culot d'ARN a ensuite été lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % (20821.296, VWR) décollé du tube par un bref passage au vortex puis a été centrifugé à 9 500 x *g* pendant 7 min à 4 °C. Après élimination du surnageant, le culot d'ARN lavé a été séché pendant une vingtaine de minutes à température ambiante puis élué dans 50 µL d'eau sans RNases. Les solutions d'ARN ont été conservées à -80 °C.

Les ARN de chaque échantillon ont été extraits en réplicats. Les solutions d'ARN des deux réplicats d'un même échantillon ont été regroupées après mesures qualitatives et quantitatives.

4.3.2.3. Quantification et contrôle qualité des acides nucléiques

- Quantification par spectrophotométrie

Les acides nucléiques sont classiquement quantifiés par absorption UV à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance est mesurée à 260 nm et cette mesure est utilisée pour quantifier les acides nucléiques où 1 unité d'absorbance à 260 nm est l'équivalent de 50 $\mu g.mL^{-1}$ d'ADN et 40 $\mu g.mL^{-1}$ d'ARN. Deux ratios permettent d'apprécier la pureté des solutions d'acides nucléiques. Les protéines absorbent également à 260 nm, mais leur maximum d'absorption se situe à 280 nm tandis que divers composés organiques (phénol, etc.) absorbent à 230 nm. Les rapports A260/A280 et A260/A230 doivent être respectivement compris entre 1,8 - 2,0 et 2,0 - 2,2 pour définir les solutions d'acides nucléiques comme pures. Des ratios inférieurs indiquent la présence de contaminants dans les solutions d'acides nucléiques.

Les mesures ont été réalisées sur deux types d'appareils : le Nanodrop 2000/2500 (ThermoScientific) et le Biophotomètre (Biophotometer plus, Eppendorf) avec l'utilisation d'une microcuvette (6138000.018, Eppendorf). Ces deux appareils sont capables de doser les acides nucléiques à partir de faibles quantités de solutions. Pour les deux types d'appareils, lors du dépôt de l'échantillon (1 µL) sur le piédestal de mesure, une colonne de liquide se forme et les mesures optiques se font à travers cette colonne.

- Électrophorèse à capillaire

L'évaluation de l'intégrité des ARN est une première étape pour obtenir des données d'expression de gènes significatives. Le Bioanalyseur 2100 (Agilent), mis à disposition par la plateforme @ BRIDGE-ICE (INRA, Jouy en Josas) a été utilisée pour effectuer les contrôles qualitatifs et quantitatifs des ARN. Cet instrument utilise des puces microfluidiques (*Lab-on-Chip*) et la méthode est basée sur l'électrophorèse à capillaire. Cette méthode permet d'apprécier la qualité des ARN via la quantification des ARNr majoritaires dans les cellules procaryotes (80 % des ARN totaux d'une cellule) puisqu'il est impossible de détecter spécifiquement les ARNm. Le bioanalyseur effectue à la fois la séparation des constituants et la détection de ces derniers par mesure de leur fluorescence par cytométrie de flux. La qualité et l'intégrité des ARN sont évaluées par l'attribution d'un score de qualité, RIN (RNA Integrity Number), allant de 0 à 10, 0 étant attribué aux échantillons dont les ARN sont entièrement dégradés et 10 pour les échantillons intègres. Le RIN, attribué par un algorithme, est calculé par le logiciel en prenant en compte divers critères tels que le taux d'ARN total, la hauteur du pic 23S, la longueur de la région entre les pics 5 et 16S, la hauteur du marqueur de poids moléculaire.

Le kit Agilent RNA 6000 Nano a été utilisé et permet l'analyse par puce d'échantillons d'ARN dont la concentration est comprise entre 25 $ng.\mu L^{-1}$ - 500 $ng.\mu L^{-1}$. L'électrophorèse a été réalisée selon les instructions du fournisseur. Les échantillons ont préalablement été dilués afin d'être dans la gamme de concentration de la puce. Après avoir centrifugé le mélange de gel filtré (65 µL) et de fluorochrome (1 µL) à 13 000 x *g* pendant 10 min, 9 µL de celui-ci ont été déposés dans les puits de la puce correspondant puis ce polymère de séparation (gel + fluorochrome) a été injecté dans le réseau de microcanaux à l'aide d'une seringue. Après l'ajout de 5 µL de tampon de charge dans l'ensemble des puits de la puce, 1 µL d'échantillon d'ARN, préalablement dénaturé à 70 °C pendant 2 min, a été

ajouté et 1 µL de marqueur de fluorescence a été ajouté dans le puits correspondant. Ce marqueur va permettre la détection des molécules de l'échantillon et ainsi permettre leur quantification par cytométrie en flux. La puce a ensuite été mélangée à l'aide d'un agitateur à 2 400 rpm (IKA MS3), pendant 1 min puis a été introduite dans le bioanalyseur.

4.3.3. Amplification des acides nucléiques par réaction de polymérisation en chaîne

4.3.3.1. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR en point final

Le gène codant pour l'ARNr 16S est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR - Polymerase Chain Reaction). Un cycle PCR se déroule en trois étapes : (1) dénaturation de l'ADN double brin pour obtenir des matrices d'ADN simple brin, (2) hybridation des amorces et (3) élongation des amorces par l'ADN polymérase et synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

La région amplifiée de ce gène est la région V1-V3 (environ 540 pb) par les amorces 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 534R (ATTACCGCGGCTGCTGG), décrites dans (Chaillou *et al*., 2014). Le mélange réactionnel contient 200 nM de chacune des deux amorces, 10 ng de matrice d'ADN à amplifier, 200 µM de chaque dNTP (N04465, Biolabs), du tampon $(NH_4)_2SO_4$ 1X (EP0402, Fermentas), 1,5 mM de $MgCl_2$ (EP0402, Fermentas), 2,5 U de Taq Polymérase (EP0402, Fermentas), le tout complété avec de l'eau en quantité suffisante pour 50 µL. Les réactions PCR ont été réalisées dans le thermocycleur PTC 200 (MJ Research) selon le programme d'amplification suivant : dénaturation de l'ADN à 94 °C pendant 2 min suivie de 25 cycles d'amplification répétant 15 s à 94 °C, 30 s à 60 °C (température d'hybridation spécifique des amorces) et 1 min à 72 °C, puis une dernière élongation à 72 °C pendant 7 min. Trois réactions de PCR indépendantes ont été réalisées pour chaque échantillon. Les réactions d'amplification ont ensuite été vérifiées par exposition aux UV après 30 min de migration à 110 V sur gel d'agarose TAE (Tris-Acétate-EDTA) 1 X

contenant 0,001 % (v/v) de Bromure d'Ethidium (BEt, EU0070, Euromedex). Les produits PCR ont ensuite été purifiés en utilisant le kit de purification QIAquick (Qiagen), selon les instructions du fournisseur : 225 µL de tampon PB du kit ont été ajoutés à 45 µL de produit PCR. La solution a été transférée sur une colonne puis centrifugée à 17 900 x *g* pendant 1 min et 750 µL de tampon de lavage PE du kit ont été ajoutés sur la colonne. Après deux centrifugations successives à 17 900 x *g* pendant 1 min, les produits PCR ont été élués dans 50 µL de tampon d'élution EB du kit (10 mM Tris : Cl ; pH 8,5). Les produits PCR purifiés ont été collectés après une dernière centrifugation à 17 900 x *g* pendant 1 min. Les trois produits PCR purifiés de chaque échantillon ont été mélangés de façon équimolaire. La qualité des produits PCR a ensuite été contrôlée par électrophorèse à capillaire d'ADN, le principe étant le même que celui décrit dans le paragraphe 4.3.2.3. Les produits PCR ont été conservés à – 20 °C.

4.3.3.2. PCR quantitative en temps réel

La PCR en temps réel repose sur le même principe d'amplification spécifique de l'ADN, mais elle offre la possibilité de suivre en continu la quantité d'ADN synthétisé au cours de la réaction grâce à des marqueurs fluorescents : sondes fluorescentes ou agents se liant à l'ADN double brin. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles, moins il faudra de cycles pour que le signal fluorescent soit significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (Cycle threshold) et apparait toujours au début de la phase exponentielle d'amplification.

La PCR en temps réel (qPCR) a été utilisée pour quantifier des espèces cibles dans les chipolatas altérées. Le mélange réactionnel contenait 5 µL de matrice d'ADN (dilué au 1/10e), 200 nM de chacune des deux amorces (dont l'efficacité vis-à-vis de l'espèce cible a été préalablement vérifiée), 10 µL de Mesa green (RT6SY2X-03, NRW00, Eurogentec), et de l'eau en quantité suffisante pour 20 µL. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans le thermocycleur Mastercycler®ep realplex2 (Eppendorf) selon le programme d'amplification suivant : dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 2 min suivie de 25 cycles d'hybridation répétant 15 s à 94 °C, 30 s à 60 °C (température d'hybridation spécifique des amorces) et 1 min à 72 °C, puis une dernière élongation à 72 °C pendant 1 min. La création des courbes de fusion en qPCR est une étape programmée supplémentaire à la fin des cycles d'amplification. À cette étape, la température passe de 60 °C à 95 °C en 20 min et l'intensité de fluorescence est mesurée en continu permettant ainsi de vérifier qu'il n'y a eu qu'un seul produit de PCR amplifié. Pour quantifier les espèces bactériennes dans les produits carnés (tous types de produits), des courbes de calibration ont été construites. Lors d'expérimentations précédentes, différentes espèces bactériennes ont été inoculées dans de la viande à des taux fixes (10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 et 10^8 UFC.g^{-1}). Les culots bactériens puis les ADN bactériens ont été extraits selon les méthodes décrites en 4.3.1 et 4.3.2.1. Les ADN ont ensuite été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques de chaque espèce bactérienne visée puis des courbes de calibration des Ct en fonction du taux d'inoculation [Ct=f(UFC.g^{-1})] ont été construites pour chaque espèce bactérienne. Les amorces choisies étaient des amorces spécifiques soit d'un gène présent en copie unique dans le chromosome bactérien (par exemple *rpoB*) ou soit d'un gène présent en plusieurs exemplaires sur le chromosome (gène codant pour l'ARNr 16S). Les résultats de ces courbes de calibration ont permis de générer deux équations génériques selon le type de gène amplifié (Tableau 6) :

Tableau 6 : équations mathématiques utilisées pour la quantification des bactéries dans les chipolatas à partir des valeurs Ct

	Type de sonde	**Équation mathématique**
Équation 7	**Sonde 16S**	$UFC.g^{-1} = e^{(\frac{ct-39,43}{-1,53})}$
Équation 8	**Gène en copie unique**	$UFC.g^{-1} = e^{(\frac{ct-40,98}{-1,44})}$

4.3.4. Techniques de séquençage à haut débit

4.3.4.1. Séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S par la technologie 454

La technologie 454 est la première technique de séquençage à haut débit utilisée en microbiologie et restait en 2014 la technologie de référence pour le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S. Développée par la société Roche Diagnostics, cette technique est basée sur l'amplification de l'ADN en émulsion (emPCR- PCR en émulsion) puis sur le pyroséquençage.

La première étape consiste à amplifier, par PCR, la région souhaitée du gène codant pour l'ARNr 16S (cf. 4.3.3.1) à l'aide d'amorces spécifiques formées de trois parties (Figure 7) :

– des fragments complémentaires à la région à amplifier (cf. 4.3.3.1), primer F (forward) et primer R (reverse)

– des adaptateurs (A et B)

– une « étiquette » (MID, Multiplex Identifier) permettant d'identifier l'échantillon

Figure 7 : configuration PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S

Les deux premières portions sont communes à tous les échantillons, seule la troisième diffère et permet, lorsque plusieurs échantillons sont séquencés en même temps, de les différencier.

À l'issue de cette première étape d'amplification, les produits PCR purifiés sont mélangés à une solution contenant des microbilles sur lesquelles sont fixés des fragments oligonucléotidiques complémentaires aux séquences des adaptateurs. En respectant un ratio nombre de molécules d'ADN/nombre de billes, un fragment unique d'ADN peut se fixer sur une bille. Les différents réactifs nécessaires à une amplification par PCR (dNTP, polymérase) ainsi que de l'huile sont ajoutés, de façon à créer une émulsion au sein de laquelle une seconde étape d'amplification par emPCR est réalisée.

À l'issue de cette deuxième étape d'amplification, les billes, couvertes de milliers ou de millions de copies de l'amplicon de départ, sont déposées sur une plaque de plusieurs millions de puits dont les diamètres permettent de ne récupérer qu'une seule bille. C'est au sein de chacun de ces puits que va se dérouler la dernière étape : le pyroséquençage (Figure 8). Cette technique de séquençage repose sur la synthèse, base par base, d'un brin complémentaire au brin matrice. Un mélange réactionnel contenant les réactifs de PCR ainsi que 3 enzymes, l'ATP-sulfurylase, la luciférase et l'apyrase, et 2 autres réactifs, l'adénosine-5'-phosphosulfate et la luciférine, est distribué dans chacun des puits. Les nucléotides (dNTP) sont séquentiellement délivrés. S'il y a incorporation d'un dNTP dans le brin d'ADN synthétisé par l'ADN-polymérase, un pyrophosphate (PPi) est libéré. En présence de

l'adénosine 5'-phosphosulfate, l'ATP-sulfurylase convertit chaque molécule de pyrophosphate en ATP qui est alors, couplé à la luciférine, utilisée par la luciférase pour former de l'oxyluciférine. Cette réaction génère un signal lumineux, dont l'intensité est proportionnelle au nombre de dNTP incorporés dans le fragment synthétisé. À la fin de la réaction, l'apyrase dégrade les nucléotides en surplus. Les signaux lumineux des différents puits sont captés simultanément et les séquences des amplicons peuvent ainsi être déterminées selon les ordres d'incorporation des dNTP et de l'intensité du signal lumineux produit.

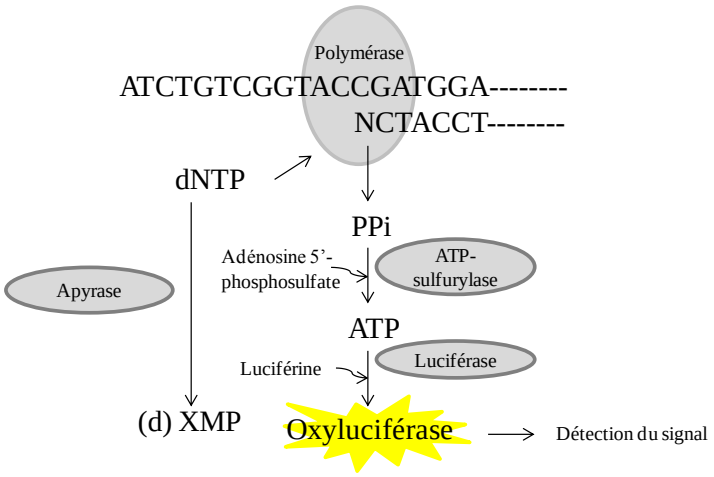


Figure 8 : représentation schématique des réactions enzymatiques ayant lieu lors du pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique qui permet de produire jusqu'à un million de séquences par réaction avec la technologie 454 GS-FLX++ et les séquences obtenues sont en moyenne de 700 pb. Depuis 2015, cette technologie de séquençage n'est plus proposée et est remplacée par des technologies dites « de troisième génération » telles que l'Ion torrent qui permet, entre autre, de déterminer une séquence d'ADN par lecture directe, sans aucune amplification.

Dans le cadre de cette étude, les gènes codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiés autour de la région V1-V3 (4.3.3.1) à l'aide d'amorces nucléotidiques spécifiques auxquelles ont été ajoutés les adaptateurs pour l'emPCR et un MID unique par échantillon (Tableau 7) :

Tableau 7 : description des amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S autour de la région V1-V3

Nom	Adaptateurs A/B	Key	MID	27F/534R
QEBP27F-AMID01	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*ACGAGTGCGT*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID01	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*AGACGCACTC*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID02	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*ATCAGACACG*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID02	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*CGTGTCTCTA*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID03	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*TCTCTATGCG*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID03	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*CATAGTAGTG*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID04	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*ATACGACGTA*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID04	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*CGTCTAGTAC*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID05	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*TGTACTACTC*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID05	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*CGTAGACTAG*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID06	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*TACTCTCGTG*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID06	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*TCGTCGCTCG*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID07	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*ACGCGAGTAT*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID07	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*ACTGTACAGT*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID08	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*AGCGTCGTCT*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID08	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*ATAGAGTACT*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID09	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*CAGTAGACGT*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID09	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*TACACACACT*	ATTACCGCGGCTGCTGG
QEBP27F-AMID010	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	*TACAGATCGT*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
QEBP534R-BMID10	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	*TAGTGTAGAT*	ATTACCGCGGCTGCTGG

Les 10 couples d'amorces ont été utilisés pour l'amplification et le séquençage des 20 échantillons. Les amplicons 16S, 300 ng.µL^{-1}, ont été séquencés par la technologie GS-FLX ++ au sein de la plateforme de séquençage Eurofins Genomics (Edersberg, Allemagne) en deux run de réactions indépendants.

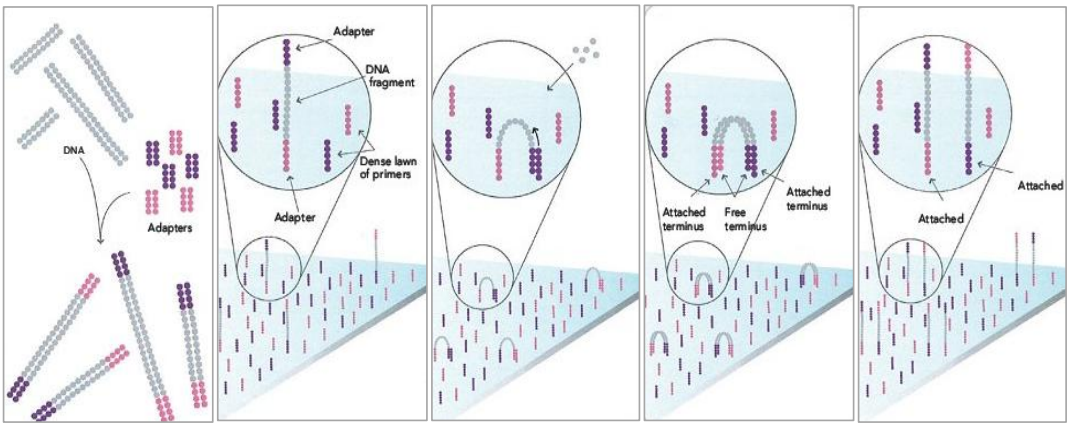
4.3.4.2. Séquençage de l'ARN par la technologie Hiseq 2000/2500

L'ensemble des étapes décrites dans ce paragraphe a été réalisé par Eurofins Genomics (Edersberg, Allemagne).

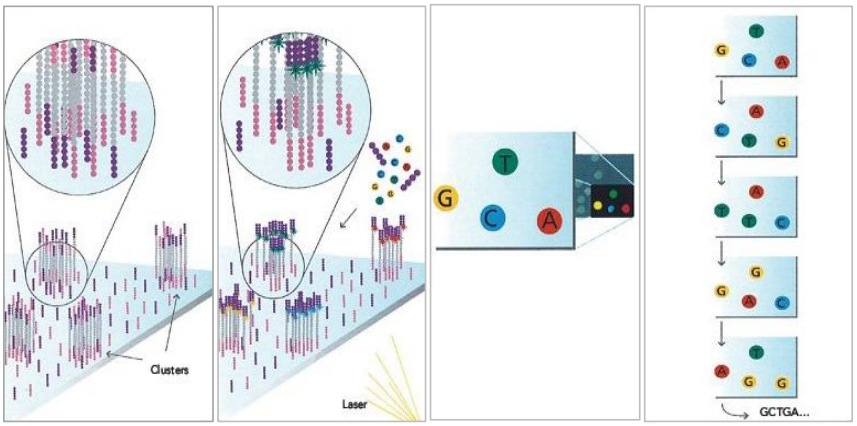
Depuis 2010, la technologie Illumina et en particulier le HiSeq s'impose comme la nouvelle stratégie pour les analyses de séquences à haut débit et notamment pour le RNASeq. Cette technologie permet de produire jusqu'à 180 millions de lectures par réaction avec des séquences obtenues plus courtes que celles obtenues par la technologie 454, de l'ordre de 200 pb. La technologie Hiseq repose sur l'amplification en pont (bridge PCR) des fragments d'ADNc puis sur un séquençage par synthèse (Figure 9).

La première étape consiste à préparer les librairies de séquençage. Les ARN à séquencer, ayant été rétrotranscrits en ADNc, sont aléatoirement fragmentés en séquences de 150 à 400 pb. Des adaptateurs sont fixés à chaque extrémité des fragments d'ADNc puis ces derniers sont fixés sur une surface de verre, appelée flow-cell, par hybridation aux adaptateurs complémentaires présents à la surface de la plaque. À la suite de cette préparation, les fragments d'ADNc sont amplifiés par PCR en pont entre deux puits afin de former des ADNc double brin, structure qui est ensuite dénaturée. Le cycle d'amplification en pont (pont, amplification, dénaturation) recommence pour former à terme un regroupement d'ADNc en une zone dense appelée cluster.

Le premier cycle de séquençage, également appelé extension de première base, consiste à incorporer les 4 nucléotides marqués par un fluorochrome simultanément sur les millions de clusters. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque cluster de fragments est captée et la première base est lue. Le cycle suivant continue en ajoutant les 4 nucléotides marqués. Après excitation, la deuxième base est déterminée de la même façon. Les cycles de séquençage sont ainsi répétés pour déterminer la séquence des fragments d'ADNc et la lecture est réalisée simultanément pour l'ensemble des clusters du flow-cell. Ainsi, la taille du fragment est égale au nombre de cycle de séquençage.



Préparation des ADNc | Attachement des ADNc à la flow-cell | Amplification en pont | Fragments double brin | Dénaturation des molécules double brin



Amplification totale | Incorporation des nucléotiques marqués | Identification de la première base incorporée | Détermination de la séquence après plusieurs cycles de séquençage

Figure 9 : séquençage des fragments d'ADNc par la technologie HiSeq 2000/2500

4.4. Analyses bio-informatiques et bio-statistiques

4.4.1. Format des données de séquençage

Les données de séquençage (d'ARNr 16S et d'ARN) sont transmises au format FASTQ. Ce format textuel permet de stocker à la fois les données nucléotidiques et les scores de qualité associés au séquençage, encodés par un caractère ASCII (Figure 10).

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

Figure 10 : format FASTQ des données de séquençage

La première ligne (commençant par @) désigne l'identifiant de la séquence. La deuxième ligne désigne la séquence nucléotidique à laquelle est associé un score de qualité pour chaque base, en quatrième ligne. Ce score de qualité est calculé en prenant en compte la probabilité estimée du pourcentage d'erreur d'incorporation de la base. Historiquement créé pour le séquençage de Sanger, ce format FASTQ est largement utilisé par les différents séquenceurs, mais l'encodage du score de qualité peut prendre différentes formes selon la plateforme. Ainsi, les données de séquençage doivent être converties au format FASTQ-Sanger, format d'entrée pour de nombreux outils.

Les données de séquençage ont été converties à l'aide de l'outil FASTQGroomer (version 1.0.4, Blankenberg *et al*., 2010) disponible sur le portail Galaxy mis à disposition au sein de la plateforme Migale (INRA – Jouy en Josas).

4.4.2. Traitement et analyses de données métagénétiques d'amplicons 16S

À titre d'information, l'annexe 8.1 liste les programmes d'analyses bio-informatiques et les paramétrages utilisés pour traiter les données de 16S.

4.4.2.1. Contrôle qualité des séquences d'amplicons 16S

Sur un fragment nucléotidique, les premières bases sont séquencées avec beaucoup de fiabilité, mais plus la lecture de la séquence avance moins le séquençage est précis. Le contrôle de la qualité des séquences obtenues est une étape primordiale pour s'assurer d'un bon clustering (regroupement) entre les différentes séquences. L'outil FastQC (version 0.10.0, disponible sur le portail Galaxy, Andrew, 2010) permet de générer un ensemble d'informations, et notamment des graphiques, sur la qualité des données de séquençage (Figure 11). Pour chaque échantillon, la fiabilité des nucléotides est évaluée en fonction de leurs positions sur la séquence grâce à la construction de boîtes à moustaches et de la courbe moyenne de qualité. La qualité des séquences est évaluée sur une échelle de 1 à 40, divisée en trois zones : de 29 à 40 : très bonne qualité, de 20 à 29 : qualité moyenne et en dessous de 20 : lectures de très mauvaise qualité.

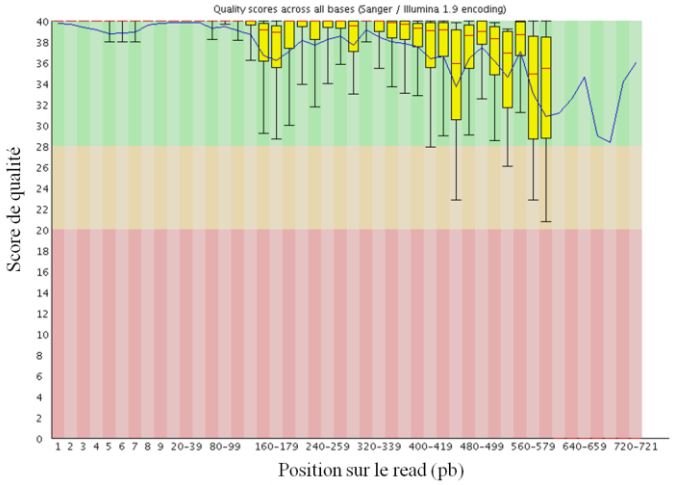


Figure 11 : score de qualité des nucléotides en fonction de leur position sur la séquence (ici de 1 à 579)

La représentation graphique de la qualité de séquençage permet de déterminer quels sont les paramètres de trimming (réduction) et les filtres à appliquer pour ne conserver que les séquences de bonne qualité. Le trimming coupe la séquence nucléotidique selon le critère fixé tandis que le filtre supprime la séquence dans son intégralité.

Selon les résultats de qualité obtenus, les données issues du pyroséquençage ont été nettoyées en utilisant l'outil PRINSEQ, version 0.20.4 (Schmieder et Edwards, 2011) avec les options suivantes : absence de base ambigüe (N) ; longueur comprise entre 350 et 650 pb ; score de qualité minimum de 10 et un score de qualité moyenne supérieure à 20 ; une coupe à l'extrémité 3' à un score de 25 et à la position 50.

4.4.2.2. Regroupement des séquences en OTU (ou clustering)

L'étape suivante dans le traitement des données de séquençage des gènes 16S consiste à regrouper les séquences sur la base d'un seuil d'identité de similarité entre les séquences. Ce regroupement (ou cluster) est appelé OTU (Operational Taxonomic Unit) et représente une unité taxonomique. Il est admis qu'au seuil de 97 % d'identité de comparaison de séquences, le cluster représente l'estimation la plus proche de l'espèce bactérienne biologique.

Pour chaque échantillon, les séquences nettoyées ont été alignées puis regroupées à un seuil de 98 % d'identité en utilisant l'outil de la Ribosomal Database Projet II, RDP aligner (Cole *et al*., 2014), disponible en ligne.

4.4.2.3. Détection et exclusion d'OTU chimériques

Un artefact majeur dans les données de séquençage des gènes 16S est la formation de séquences chimériques lors de l'amplification PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S. Lors d'un cycle d'amplification, l'élongation d'une séquence peut être stoppée, générant un fragment oligonucléotidique de courte taille. Ce fragment va être utilisé en tant qu'amorce de

synthèse pour l'amplification d'une autre séquence. Ainsi le nouveau brin synthétisé sera le résultat de l'amplification de deux séquences d'ARNr 16S différentes, pouvant ne pas provenir de la même espèce bactérienne. Il est donc nécessaire d'exclure ces séquences afin de ne pas biaiser l'identification taxonomique des OTU.

L'outil Find Chimeras du logiciel Decipher (Wright *et al*., 2012), disponible en ligne, a été développé pour automatiser cette tâche. Il est basé sur l'analyse phylogénétique des séquences. Chaque séquence est évaluée en identifiant un ensemble de petits fragments qui sont rares dans le groupe phylogénétique auquel la séquence est assignée, mais fréquent dans d'autres groupes phylogénétiques. L'utilisation de l'outil en ligne est simple ; les séquences ont été téléchargées en format .fastq et les fichiers générés en format .txt contiennent les séquences chimériques détectées.

4.4.2.4. Assignation taxonomique de chaque OTU

À l'issue du regroupement en clusters avec RDP, pour chaque OTU, la séquence représentative a été désignée comme celle ayant la somme des carrés des distances la plus faible entre les séquences de l'OTU et l'assignation taxonomique a été réalisée sur cette séquence représentative.

L'assignation taxonomique a été effectuée par un alignement BLASTN contre la base non redondante (nr99) de la base de données LTP (Living Tree Project) Silva, version 111 (Quast *et al*., 2013). L'algorithme utilisé permet d'assigner les OTU jusqu'au niveau de l'espèce. Une deuxième assignation taxonomique a été réalisée, pour les OTU dont l'assignation taxonomique n'a pu être déterminée par la base LTP, à l'aide de l'outil SINA Aligner de la base de données Silva (Pruesse *et al*., 2012) et de la base de données EzTaxon (Kim *et al*., 2012) contenant les séquences des gènes codant pour les ARNr 16S d'espèces bactériennes non cultivables.

4.4.2.5. Quantification des OTU

À la suite de l'assignation taxonomique, une table d'abondance des OTU pour chaque échantillon a été créée. Pour pouvoir analyser et comparer l'abondance des OTU entre les échantillons, il faut normaliser les données afin de corriger les biais liés à la technique utilisée (e.g. profondeur de séquençage, amplification PCR). Il existe plusieurs méthodes de normalisation, mais toutes reposent sur un principe commun : déterminer, pour chaque échantillon, un facteur d'échelle qui sera utilisé en coefficient multiplicateur pour corriger le comptage de l'échantillon. Ici, les données brutes d'abondance pour chaque OTU ont été divisées par le ratio entre la profondeur de séquençage de l'échantillon et la profondeur médiane de séquençage de tous les échantillons, comme décrit dans Chaillou *et al*., (2015). Les résultats d'abondance normalisés ont ensuite été convertis en logarithme décimal. L'abondance des OTU, en fonction de la condition expérimentale considérée, a été représentée sous forme de diagramme en barres construit avec le package UsingR du logiciel R, version 2.0.5 (Verzani, 2015).

4.4.2.6. Analyse de la diversité bactérienne

- <u>Richesse et estimation de la richesse</u>

La richesse (S) se réfère au nombre d'espèces différentes présentes dans la communauté. Ainsi, pour chacune des 4 conditions expérimentales testées, nous avons compté le nombre d'OTU différent présents dans les échantillons. La richesse bactérienne des échantillons a été représentée sous forme de box-plots construits avec le package UsingR du logiciel R, version 2.0.5 (Verzani, 2015).

L'index du Chao1 est l'estimateur de richesse spécifique maximale le plus couramment utilisé et permet d'estimer le nombre d'OTU non observés à partir du nombre

d'OTU total et des OTU en faible abondance (singletons – 1 read, et doubletons – 2 reads) (Chao, 1984) :

$$\text{Équation 9 : } S_{chao1} = S_{obs} + \frac{S^2}{2 \times D}$$

Avec S_{chao1} : la richesse estimée par l'index du Chao1 ; S_{obs} : la richesse observée ; S : les OTU singletons et D : les OTU doubletons. Cet estimateur a été calculé à l'aide d'un tableur pour chacun des 20 échantillons.

La représentation de la richesse spécifique par les courbes de raréfaction permet d'estimer si l'effort d'échantillonnage a été suffisant pour collecter exhaustivement les espèces présentes. Cette analyse a été menée en rapportant la richesse bactérienne (nombre d'OTU différents) des 20 échantillons en fonction de la profondeur de séquençage (nombre de lectures total par échantillon). Pour chaque condition expérimentale, une courbe de raréfaction (regroupant 5 échantillons) a été construite à l'aide de l'outil Phyloseq (McMurdie et Holmes, 2013).

- <u>Équilibre d'abondance (evenness)</u>

L'evenness est une deuxième mesure de la diversité d'une communauté bactérienne qui caractérise la régularité de la distribution des OTU au sein d'un échantillon. L'evenness a été calculé pour les 20 échantillons et correspond à la médiane (en $\log_{10}$) des différences d'abondance entre l'OTU dominant et les OTU sous-dominants. L'evenness a été représentée sous forme de box-plots construits avec le package UsingR du logiciel R, version 2.0.5 (Verzani, 2015)

4.4.3. Pipeline d'analyse des données de RNAseq

À titre d'information, l'annexe 8.2 liste les programmes d'analyses bio-informatiques et les paramétrages utilisés pour traiter les données de RNAseq.

4.4.3.1. Nettoyage des séquences

Comme dans le cas des données issues du pyroséquençage (4.4.2.1), la qualité des données de séquençage a été contrôlée à l'aide de l'outil FastQC (disponible sur le portail Galaxy). De même, l'outil Prinseq a été utilisé pour nettoyer les séquences selon les critères suivants : longueur minimale de 20 pb ; qualité moyenne supérieure à 20 ; absence de base ambigüe (N) et coupure à l'extrémité 3' des nucléotides ayant une qualité inférieure à 10.

Les ARN ribosomaux sont les plus abondants dans les cellules bactériennes (~ 80 %). En amont du séquençage des ARN rétrotranscrits, le kit Ribo-Zero™ Magnetic kit (MRZMB126, Illumina) a été utilisé afin de dépléter les ARNr et de ne conserver que les ARNm. Cependant, une fraction des ARNr est résiduelle et est séquencée. Une deuxième déplétion des séquences d'ARNr a été réalisée après le séquençage. À l'aide de l'outil Ribopicker, version 0.4.3 (Schmieder et Edwards, 2011), les séquences ont été alignées contre la base de références Silva, version 119 (Quast *et al.*, 2013) et les séquences correspondants à des ARNr ont été supprimées.

4.4.3.2. Identification et quantification des transcriptomes

La seconde étape à l'analyse de données de RNAseq consiste à identifier les espèces bactériennes actives dans les chipolatas par alignement des séquences d'ARN contre des génomes bactériens de référence. Cette identification a été réalisée en deux étapes. Premièrement, les séquences ont été alignées contre une base très générique de génomes de référence (~ 470 génomes) sélectionnés pour inclure le nombre le plus large d'espèces. Ces

espèces ont notamment été identifiées, lors de travaux précédents, dans les produits carnés et les produits de la mer altérés (Chaillou *et al*., 2015). Cette base, actuellement dans sa version 7.0 (DB7, S. Chaillou, communication personnelle), construite depuis 2012, a consisté à l'intégration de génomes disponibles publiquement (Genome List au NCBI), mais résulte également d'un effort de séquençage, de la part de l'équipe Food Microbial Ecology (FME, INRA, Unité Micalis), de souches et d'espèces bactériennes pour lesquelles peu ou pas de génomes n'étaient disponibles publiquement. Les annotations fonctionnelles de chacun des génomes ont été extraites directement des fichiers de la base de données GenBank du NCBI (Benson *et al*., 2013) pour les génomes publics ou des annotations automatiques issus de la plateforme MicroScope du Génoscope (Evry, Vallenet *et al*., 2009) pour les génomes nouveaux non publiés.

L'ensemble des génomes a été regroupé dans un seul fichier pour créer la base de références DB7 qui comprend 470 références bactériennes (314 souches bactériennes, 166 espèces bactériennes). La liste des références génomiques de cette base de données DB7 est disponible dans l'annexe 8.3. Les séquences d'ARN ont ensuite été alignées contre cette base de données à l'aide de l'outil Bowtie2, version 2.2.6 (Langmead et Salzberg, 2012). Les fichiers de sortie de l'étape d'alignement sont en format .sam (Sequence Alignment/Map format), non exécutables. L'utilisation des outils Samtools (Li *et al*., 2009) a permis de convertir les fichiers d'alignement en fichiers exécutables. La table d'abondance (T1) des références génomiques en fonction des échantillons a été créée (Figure 12).

16 échantillons

470 références génomiques

	$\mathbf{E_1}$	…	$\mathbf{E_{16}}$	
R_1	$n_{E1,R1}$	…	$n_{E16,R1}$	$\Sigma\, n_{R1}$
…	…	…	…	…
R_{470}	$n_{E1,R470}$		$n_{E16,R470}$	$\Sigma\, n_{R470}$
	$\Sigma\, n_{E1}$	…	$\Sigma\, n_{E16}$	

Figure 12 : représentation schématique de la table d'abondance brute T1 des 470 références génomiques de la base DB7

Avec E_1 à E_{16} : les 16 échantillons ; R_1 à R_{470} : les 470 références génomiques de la DB7 ; n_{ER} : l'abondance de la référence R pour l'échantillon E ; $\Sigma\, n_E$: la profondeur de séquençage (nombre de lectures) pour l'échantillon E et $\Sigma\, n_R$: l'abondance totale de la référence génomique R.

La deuxième étape à l'identification des espèces actives dans les chipolatas a été réalisée en affinant l'abondance des références génomiques dans les échantillons. Une deuxième base de génomes bactériens a été créée (DBPVS) en sélectionnant les génomes pour lesquels les références génomiques avaient un alignement supérieur à 1 000 lectures et étaient présentes dans au moins trois échantillons. Les génomes sélectionnés ont été extraits de la base DB7 puis regroupés dans un fichier unique. Un deuxième alignement des séquences d'ARN contre cette base DBPVS a été réalisé, à l'aide de l'outil Bowtie2, les fichiers de sortie de l'alignement ont été convertis en fichiers exécutables à l'aide des outils Samtools et une deuxième table d'abondance des références génomiques (T2) en fonction des échantillons a été créée (Figure 13).

16 échantillons

112 références génomiques

	$\mathbf{E_1}$	…	$\mathbf{E_{16}}$	
R_1	$n_{E1,R1}$	…	$n_{E16,R1}$	$\Sigma\, n_{R1}$
…	…	…	…	…
R_{112}	$n_{E1,R112}$		$n_{E16,R112}$	$\Sigma\, n_{R112}$
	$\Sigma\, n_{E1}$	…	$\Sigma\, n_{E16}$	

Figure 13 : représentation schématique de la table d'abondance brute T2 des 112 références génomiques de la base DBPVS

Avec E_1 à E_{16} : les 16 échantillons ; R_1 à R_{112} : les 112 références génomiques de la DBPVS ; n_{ER} : l'abondance de la référence R pour l'échantillon E ; $\Sigma\, n_E$: la profondeur de séquençage (nombre de lectures) pour l'échantillon E et $\Sigma\, n_R$: l'abondance totale de la référence génomique R.

Les références (chromosomiques et plasmidiques) de chaque souche bactérienne ont été ajoutées, les données d'abondance ont été normalisées sur la médiane puis converties en logarithme décimal. L'abondance des transcriptomes a été représentée par un graphique Krona (Ondov *et al*., 2011), créé à l'aide d'un modèle disponible en ligne pour les tableurs et sous forme de carte de chaleur construite avec l'outil heatmap.2 du package gplots2, version 3.0.1 (Wickham *et al*., 2013). Dans cette représentation, la distance entre les individus a été calculée par la distance euclidienne. On appelle distance euclidienne entre *x* et *y* la distance définie par :

Équation 10 : $$d(x,y) = \sqrt{\sum_{i=1}^{m} (x_i - y_i)^2}$$

Les individus ont été regroupés selon la stratégie complete linkage où le regroupement est effectué par la plus grande distance entre les éléments de deux classes.

4.4.3.3. Identification et assignation fonctionnelle des gènes exprimés

La troisième étape à l'analyse de données de RNAseq consiste à identifier et quantifier les gènes exprimés dans chaque échantillon dans l'ensemble du métagénome. Les informations d'abondance de chaque gène ont été extraites à l'aide d'un catalogue de gènes de l'ensemble des références génomiques. Trois catalogues de gènes différents ont été construits. Le premier comporte l'ensemble des gènes des 64 souches bactériennes du métagénome. Pour construire ce catalogue de gènes, l'ensemble des séquences nucléotidiques des gènes ont été regroupées dans un fichier. Le deuxième catalogue de gènes comporte les clusters de gènes orthologues des souches de *L. sakei* et enfin le troisième catalogue de gènes comporte les clusters de gènes orthologues des souches de *Serratia* spp.

- <u>Clusters de gènes orthologues</u>

Le clustering consiste à regrouper les gènes orthologues des différents génomes selon un seuil d'identité défini (Figure 14) :

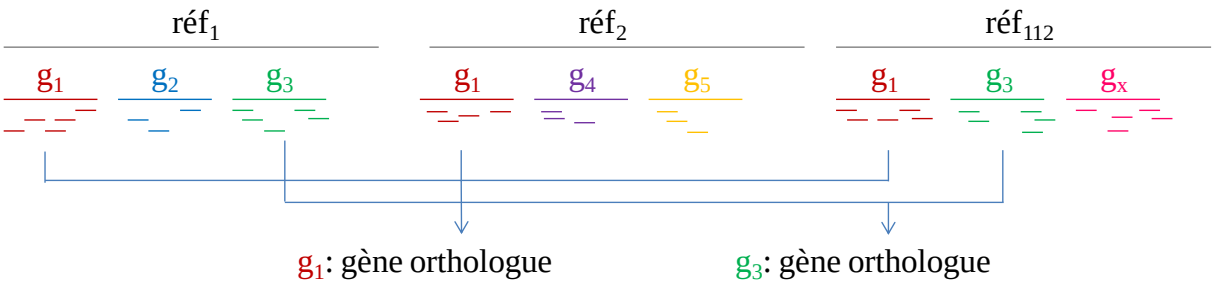


Figure 14 : représentation schématique d'un gène orthologue

Avec $réf_1$ à $réf_{112}$: les références génomiques de la base DBPVS ; g_1 à g_x : les gènes des références génomiques. Ainsi, le nombre de reads du gène $g_1 = g_1réf_1 + g_1réf_2 + g_1réf_x$.

Pour définir le seuil d'identité de regroupement des gènes de *L. sakei*, nous avons aligné (par blastn) les séquences nucléotidiques de 11 gènes de ménage (*ldhL*, *recA*, *dnaK*, *glpF*, *hemN*,

tuf, *pepV*, *rpoB*, *dnaA*, *atpA* et *gapA*) des 7 souches de *L. sakei*. Le résultat de ces alignements nous a permis de définir un seuil d'identité pour *L. sakei* de 95 % sur 80 % de la longueur des séquences. Pour réaliser le clustering, nous avons compilé dans un seul fichier les séquences nucléotidiques de l'ensemble des gènes des souches de *L. sakei*, en mettant la souche *L. sakei* 23K en premier. L'ordre des souches a de l'importance pour l'identification de la référence de chaque cluster. Le clustering des gènes (sur la base des séquences nucléotidiques) a ensuite été réalisé à l'aide de l'outil cdhit (Li et Godzik, 2006) qui fonctionne de la façon suivante : le premier gène sert de référence au premier cluster (donc le premier gène de *L. sakei* 23K). Le deuxième gène est aligné contre le premier. Si le pourcentage d'alignement est supérieur au seuil fixé, le deuxième gène est orthologue au premier. Si au contraire, le pourcentage d'alignement est inférieur au seuil, ce deuxième gène n'est pas considéré comme gène orthologue et se trouve dans un deuxième cluster. Et ainsi de suite, chaque gène (pris dans l'ordre d'incorporation du fichier compilé) est aligné contre la référence de chaque cluster.

Pour définir le seuil d'identité de regroupement des gènes de *Serratia* spp. nous avons aligné les séquences protéiques (plus conservées que les séquences nucléotidiques) des 11 gènes de ménage cités précédemment, des 9 souches de *Serratia* spp. Le résultat de ces alignements nous a permis de définir un seuil d'identité pour *Serratia* spp. de 80 % sur 80 % de la longueur des séquences. Pour réaliser le clustering, nous avons compilé dans un seul fichier les séquences protéiques de l'ensemble des gènes des souches de *Serratia*, en mettant la souche *S. proteamaculans* MFPA44A14-01 en premier.

- <u>Catalogues de gènes</u>

La procédure décrite ci-dessous est la même pour les trois catalogues de gènes (gènes du métagénome, clusters de gènes orthologues de *L. sakei* et clusters de gènes orthologues de

Serratia spp.). Les catalogues, au format gff3 [general feature format, version 3 (Stein, 2013)], recensent pour chaque gène l'ensemble des informations nécessaires pour caractériser les séquences (Figure 15). Ainsi, chaque gène (en ligne) est décrit par cinq informations obligatoires. En colonne 1 est indiqué le génome d'origine ; en colonne 3, le type du gène ; en colonnes 4 et 5, les coordonnées de position du gène sur le génome et en colonne 9, le locus-tag du gène (locus-tag du gène quand il n'y a pas eu de clustering ou locus-tag de la référence du cluster auquel le gène appartient)

```
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	210	1556	.	.	.	ID=kLSA0001
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	1734	2873	.	.	.	ID=kLSA0002
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	3116	3343	.	.	.	ID=kLSA0003
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	3350	4477	.	.	.	ID=kLSA0004
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	4514	6490	.	.	.	ID=kLSA0005
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	6538	9111	.	.	.	ID=kLSA0006
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	9348	9644	.	.	.	ID=kLSA0007
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	9683	10195	.	.	.	ID=kLSA0008
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	10226	10465	.	.	.	ID=kLSA0009
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	10683	12716	.	.	.	ID=kLSA0010
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	12737	13189	.	.	.	ID=kLSA0011
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	13320	14717	.	.	.	ID=kLSA0012
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	14913	15044	.	.	.	ID=kLSA_0013
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	15068	16408	.	.	.	ID=kLSA0013
LACTOBACILLUS.SAKEI.23K .	cds	16777	17517	.	.	.	ID=kLSA0014
```

Figure 15 : extrait d'un catalogue de gènes au format gff3

Les fichiers (au format .sam) de sortie de l'alignement des séquences contre la base de données DBPVS contiennent les positions exactes d'alignement sur les génomes. L'outil Bedtools coverage, version 2.26.0 (Quinlan et Hall, 2010) identifie les gènes en croisant les informations d'alignement avec les informations descriptives présentes dans les catalogues de gènes. Ainsi, pour chaque échantillon, une liste de chacun des gènes avec leur abondance respective a été générée puis une troisième table d'abondance (T3) des gènes exprimés en fonction des échantillons a été créée (Figure 16). Trois tables d'abondances ont donc été créées, une table d'abondance pour les gènes du métagénome, une pour les clusters de gènes orthologues de *L. sakei* et une pour les clusters de gènes orthologues de *Serratia* spp.

16 échantillons

	$\mathbf{E_1}$	…	$\mathbf{E_{16}}$	
g_1	$n_{E1,g1}$	…	$n_{E16,g1}$	$\Sigma\, n_{g1}$
…	…	…	…	…
g_x	$n_{E1,gx}$		$n_{E16,gx}$	$\Sigma\, n_{gx}$
	$\Sigma\, n_{E1}$	…	$\Sigma\, n_{E16}$	

Figure 16 : représentation schématique des tables d'abondance des gènes exprimés en fonction des échantillons

Avec E_1 à E_{16} : les 16 échantillons ; g_1 à g_x : les gènes du catalogue de gènes ; n_E : l'abondance du gène g pour l'échantillon E ; $\Sigma\, n_E$: la profondeur de séquençage (nombre de lectures) pour l'échantillon E et $\Sigma\, n_g$: l'abondance totale du gène g.

- Description et classification fonctionnelle

La description et la classification fonctionnelle de chaque gène exprimé ont été extraites à partir de l'annotation automatique des génomes disponible sur la plateforme MicroScope du Génoscope (Evry, Vallenet *et al*., 2009).

4.4.3.4. Analyse différentielle de l'expression des gènes exprimés

La dernière étape de l'analyse de données de RNAseq consiste à identifier et comparer les niveaux d'expression de chaque gène entre deux ou plusieurs conditions. Un gène est déclaré différentiellement exprimé si son niveau d'expression est significativement ($p < 0,05$) différent d'une condition à l'autre. Les grandes étapes de l'analyse différentielle sont : la normalisation des données, l'analyse différentielle et les tests multiples. Le package DESeq2 version 1.10.1 (Love *et al*., 2014), utilisé dans ces travaux, intègre toutes ces étapes, décrites ci-après.

➢ Normalisation des données

Avant de normaliser les données, un filtre de sélection des gènes est appliqué. Il s'agit de ne conserver que les gènes répondant à certains critères : abondance totale, prévalence, nombre minimum de lectures, etc. Dans le cadre de cette étude, les gènes pour lesquels le comptage total est nul ont été supprimés.

La normalisation DESeq, incluse dans le package DESeq2, se base sur la moyenne géométrique d'expression des gènes dans chaque échantillon. La normalisation des comptages est réalisée selon la procédure, en 3 étapes, décrite ci-dessous :

1. La moyenne géométrique des comptages de chaque gène est calculée créant un pseudo-échantillon composé des comptages moyens de chaque gène (Figure 17) :

1.	**E_1**	**…**	**E_{16}**	**Pseudo-échantillon**
g_1	$n_{E1,g1}$	…	$n_{E16,g1}$	$A_1 = (n_{E1,g1} \times \ldots \times n_{E16,g1})^{1/16}$
…	…	…	…	…
g_x	$n_{E1,gx}$	…	$n_{E16,gx}$	$A_x = (n_{E1,gx} \times \ldots \times n_{E16,gx})^{1/16}$

Figure 17 : calcul de l'abondance moyenne (moyenne géométrique) de chaque gène

Avec E_1 à E_{16} : les 16 échantillons ; g_1 à g_x : les gènes du catalogue de gènes ; A_g : la moyenne géométrique des comptages du gène *g*.

2. Chaque comptage est divisé par le comptage du pseudo-échantillon du gène considéré puis la médiane des ratios obtenus pour chaque échantillon est calculée (Figure 18) :

2.	**E_1**	**…**	**E_{16}**
g_1	$(n_{E1,g1})/A_1$	…	$(n_{E16,g1})/A_1$
…	…	…	…
g_x	$(n_{E1,gx})/A_x$	…	$(n_{E16,gx})/A_x$
	$M_{E1}=Me(n_{E1,g}/A)$	…	$M_{E16}=Me(n_{E16,g}/A)$

Figure 18 : calcul du facteur de normalisation

Avec E_1 à E_{16} : les 16 échantillons ; g_1 à g_x : les gènes du catalogue de gènes ; A_g : la moyenne géométrique des comptages du gène *g* ; M_E : la médiane des ratios obtenus pour l'échantillon E.

3. La médiane calculée pour chaque échantillon est le facteur de normalisation par lequel tous les comptages seront multipliés (Figure 19) :

3.	**E_1**	**…**	**E_{16}**
g_1	$(n_{E1,g1}) \times M_{E1}$	…	$(n_{E16,g1}) \times M_{E16}$
…	…	…	…
g_x	$(n_{E1,gx}) \times M_{E1}$	…	$(n_{E16,gx}) \times M_{E16}$

Figure 19 : multiplication de chaque comptage par le facteur de normalisation

Avec E_1 à E_{16} : les 16 échantillons ; g_1 à g_x : les gènes du catalogue de gènes ; M_E : la médiane des ratios obtenus pour l'échantillon E.

- <u>Analyse différentielle</u>

L'analyse différentielle consiste à tester l'hypothèse nulle selon laquelle le rapport des moyennes d'expression entre les deux conditions (FoldChange) est exactement égal à zéro, autrement dit, l'expression du gène n'est pas affectée par l'une ou l'autre des conditions. Il existe différentes méthodes statistiques pour identifier les gènes différentiellement exprimés

par exemple le test du rapport de vraisemblance ou encore le test exact de Fisher (Fisher 1922). Cependant, lorsque les données de comptage de RNAseq suivent une distribution binomiale négative, le test de Wald (Wald, 1943) est le test le plus puissant et le plus utilisé pour détecter les gènes exprimés de manière différentielle. La p-valeur associée à ce test est la probabilité d'obtenir une valeur au moins aussi extrême que celle que l'on observe si l'hypothèse nulle est vraie.

L'outil DEseq2 teste pour chaque gène individuellement la différence d'expression entre les deux conditions. Pour cette analyse, il est nécessaire de définir la condition de référence qui va permettre d'identifier l'influence de la condition expérimentale sur l'expression (sur ou sous-exprimée) du gène par rapport à la condition de référence. Ainsi, les échantillons avec 2,0 % de NaCl ont été définis comme étant la condition de référence afin d'évaluer l'influence de la réduction de la teneur en sel (échantillons à 1,5 % de NaCl) sur l'expression des gènes.

- <u>Tests multiples</u>

Il existe cependant une probabilité non nulle (risque de première espèce α) de détecter de faux positifs. En effet, dans le cas des données de RNAseq où le test statistique est répété des millions de fois, le risque de rejeter l'hypothèse nulle augmente d'autant plus, autrement dit, la probabilité d'identifier à tort un gène différentiellement exprimé est élevée. Ainsi, pour contrôler la proportion de gènes différentiellement exprimés ($p < 0,05$), il existe deux méthodes d'ajustement : la méthode de Bonferroni et la méthode de Benjamini-Hochberg (Hocherberg et Benjamini, 1990). La première procédure consiste à contrôler le Family Wise Error Test (FWER) au niveau de test, c'est-à-dire la probabilité d'avoir au moins un « faux-positif ». Chacun des tests est réalisé à un taux de α/G où α est le niveau de chacun des tests (en général 5 %) et G le nombre total de tests effectués. La procédure de Benjamini-Hochberg

consiste à contrôler le False Discovery Rate (FDR) au niveau de test, c'est-à-dire la proportion de « faux positifs » dans les gènes déclarés différentiellement exprimés. La p-valeur corrigée selon la procédure de Benjamini-Hochberg est définie par : p_{BH} = min (p* nbp/j, 1) où p étant la p-valeur d'origine, nbp le nombre de p-valeurs calculées au total et j le rang de la p-valeur lorsque les p-valeurs sont rangées par ordre croissant. Il est moins conservatif de contrôler une proportion qu'un risque, ainsi le nombre de gènes différentiellement exprimés sera identifié après ajustement par la méthode de Benjamini-Hochberg.

Ainsi, les gènes déclarés différentiellement exprimés sont ceux dont la p-value ajustée est inférieure au niveau de test fixé (5 %). Ces gènes ont été représentés par des volcano-plot, dont l'outil permettant cette représentation est disponible dans le package DESeq2.

RÉSULTATS

5. RÉSULTATS

5.1. Stratégie expérimentale pour évaluer les impacts de la réduction de sel sur la communauté bactérienne des chipolatas associée à l'altération

Lors de ces travaux, nous avons évalué les impacts de la réduction de sel sur le développement des communautés bactériennes altérantes et de *Salmonella* ser. Typhimurium dans les chipolatas. Pour établir les interactions entre les communautés bactériennes et le développement de l'altération des chipolatas, nous avons mis en place trois niveaux d'analyses : caractérisation de l'altération, description de la diversité de la communauté bactérienne couplée à la quantification des espèces et mesure des fonctions métaboliques de cette communauté. Les résultats des deux premiers niveaux d'analyses sont présentés dans la partie 5.2 de ce chapitre et le troisième niveau est présenté dans la partie 5.3. Cependant, la démarche expérimentale a été élaborée selon une stratégie commune (Figure 20) que nous présentons dans cette première partie.

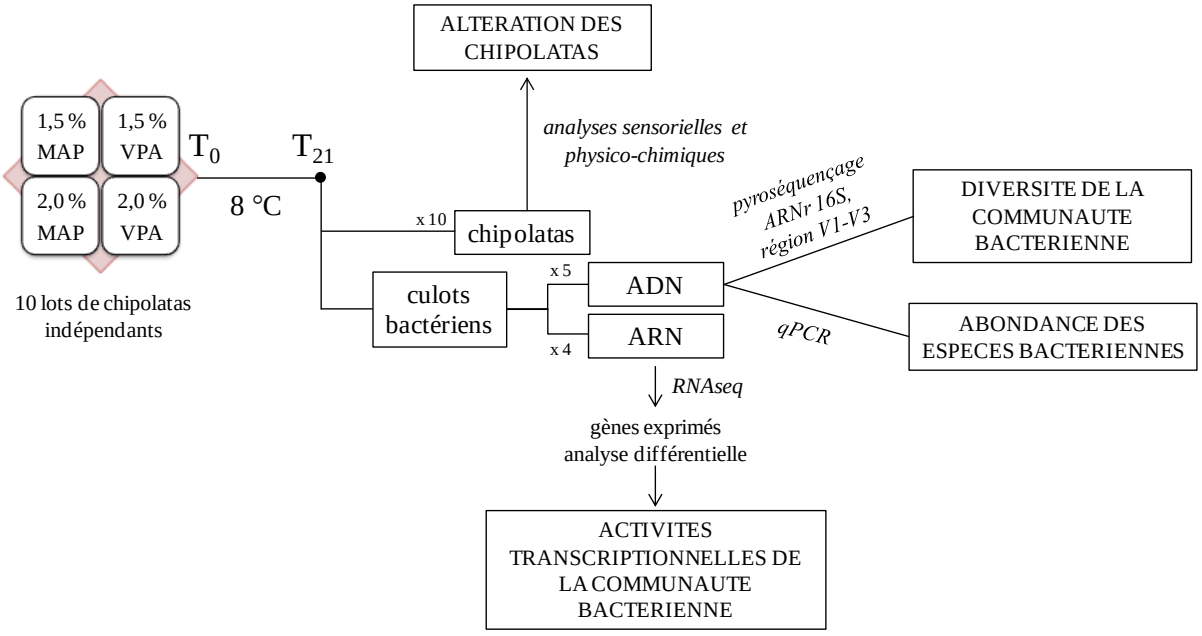


Figure 20 : représentation schématique de la stratégie expérimentale mise en œuvre pour l'analyse de l'altération et de la communauté bactérienne des chipolatas

Les chipolatas de porc crues ont été fabriquées selon le plan expérimental à 4 conditions incluant deux concentrations en NaCl (2,0 % et 1,5 %) et deux types de conditionnement (MAP - 50 % de CO_2 + 50 % de N_2 et VPA - sous vide). Les chipolatas ont été conservées à 8 °C pendant 21 jours (cf. matériels et méthodes, paragraphes 4.1.1.1 et 4.1.3.1 pour plus de précisions). Pour prendre en compte la variabilité microbiologique de la viande utilisée, 10 lots indépendants [10 lots de viande (matières premières) différents, de B01 à B10] ont été fabriqués.

Après cette période de stockage de 21 jours, l'altération des chipolatas a été caractérisée par des méthodes sensorielles (description de l'aspect et des odeurs produites) et physico-chimiques (mesures de la couleur, de la production de gaz et d'exsudat et du pH) en comparaison avec des échantillons frais non altérés (T_0), conservés à - 20 °C pendant 21 jours.

Pour décrire la communauté bactérienne des chipolatas, nous avons choisi d'utiliser une méthode globale, pyroséquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S (région V1-V3), combinée à de la quantification par PCR quantitative (qPCR). Au vu des coûts de séquençage, nous avons fait le choix de caractériser la diversité bactérienne de 20 échantillons des lots B04, B05, B06, B08 et B10 parmi le large plan expérimental réalisé. Ce choix a été fait selon les critères physico-chimiques et sensoriels des chipolatas altérées qui étaient semblables et sur le fait que certains lots ont été défectueux à l'une des étapes (lot B01 : problème technique dans l'extraction des acides nucléiques, lot B09 : teneur en sel identique dans tous les échantillons, lots B02 et B03 : mélange d'épices différent des autres lots de fabrication, lot B07 semblable au lot B08). À 21 jours de conservation, les ADN bactériens des 20 échantillons ont été extraits directement des chipolatas, les régions V1-V3 des gènes codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiées puis séquencées par la technologie de

pyroséquençage 454 (cf. matériels et méthodes, paragraphes 4.3.2.1, 4.3.3.1 et 4.3.4.1 pour plus de précisions).

Pour caractériser les activités métaboliques de la communauté bactérienne après 21 jours de conservation, nous avons décrit les activités transcriptionnelles de cette communauté par séquençage des ADNc. L'ensemble des ARN bactériens des 10 lots de fabrication n'a pu être séquencé. Pour assurer une sécurité minimale, dans le cas où une répétition ne serait pas exploitable, nous avons fait le choix d'analyser 4 répétitions par condition, soit 4 lots de fabrication (4 lots x 4 conditions). Le choix des lots a été fait selon deux critères : (1) utilisation des lots utilisés pour la description de la diversité bactérienne par pyroséquençage des gènes 16S et (2) la qualité des ARN de ces lots. Ainsi ont été séquencés les lots B04, B05, B06 et B07 ; les ARN du lot B08 étant dégradés, le choix s'est porté sur les échantillons du lot B07 ayant des caractéristiques d'altération (sensorielles et physico-chimiques) proches. Le lot B10 a été écarté car il était différent (sensoriellement) des autres lots. Après rétro-transcription des ARN extraits en ADNc, ces derniers ont été séquencés par la technologie Hiseq 2000/2500 (cf. matériels et méthodes, paragraphes 4.3.2.2 et 4.3.4.2 pour plus de précisions).

5.2. La réduction de sel dans les chipolatas augmente l'altération tout en réduisant la diversité bactérienne

5.2.1. Hypothèses et objectifs

Dans les produits de charcuterie, la baisse de sel va engendrer une modification de l'environnement (du produit) et des communautés bactériennes présentes dans le produit. Par conséquent, ce changement au sein des communautés risque d'impacter le développement de l'altération. Les objectifs de ces travaux étaient (1) de décrire les communautés bactériennes des chipolatas, (2) de corréler ces communautés aux observations d'altération et (3) de mesurer l'impact du sel sur ces deux paramètres dans des conditions d'atmosphère définies.

5.2.2. Méthodologie

La stratégie mise en place pour répondre à ces objectifs est présentée dans la section 5.1. et le détail des expérimentations est présenté dans l'ensemble du chapitre 0, matériels et méthodes.

5.2.3. Principaux résultats

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée page 109 et quelques résultats principaux sont présentés dans cette section. Après 21 jours de conservation à 8 °C, l'ensemble des chipolatas, quelle que soit la teneur en sel ou le type de conditionnement et quel que soit le lot, était altéré, mais à des degrés différents. Les échantillons avec la teneur réduite en sel ont montré un degré d'altération supérieur comparé à leurs homologues non réduits en sel et ces données étaient corrélées à une augmentation de la production d'exsudat et à une légère baisse de pH. Le type de conditionnement modifiait fortement les odeurs d'altération identifiées ; les odeurs rances étaient principalement associées au conditionnement sous vide tandis que le conditionnement sous atmosphère

modifiée était caractérisé par la production d'odeurs aigres. De plus, les données sensorielles ont permis d'identifier un gradient d'altération allant de la combinaison VPA et 2,0 % de sel, où les odeurs des échantillons étaient proches de celles des échantillons témoins (non altérés) à la combinaison MAP et 1,5 % de sel qui présente les plus fortes intensités d'altération.

Par les dénombrements sur les milieux de culture, nous avons montré que la population bactérienne totale viable des chipolatas altérées était d'au moins 8 $\log_{10}$ UFC.g^{-1} de chipolatas. Cependant, les variations d'intensité d'altération n'ont pu être corrélées à la charge bactérienne totale puisqu'aucune différence de taux de population n'a pu être observée selon les conditions de sel et d'atmosphère de conditionnement. Ceci indique donc que les différences d'altération observées ne sont pas liées à la charge microbienne totale, mais sont plutôt liées à une différence de diversité bactérienne dans les échantillons.

L'analyse comparée de la richesse bactérienne (nombre total d'OTU différents) a révélé que le conditionnement sous vide permettait de maintenir une richesse bactérienne plus élevée que le conditionnement sous atmosphère modifiée, 22 ± 6 OTU *versus* 16 ± 4 OTU respectivement. La réduction de la teneur en sel n'a, quant à elle, pas affecté de manière significative la richesse bactérienne des chipolatas après 21 jours de conservation.

L'écosystème bactérien des chipolatas est constitué d'un noyau principal bactérien composé de 6 OTU dominants et conservés dans 90 % des échantillons : *L. sakei*, *L. piscium*, *C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *S. proteamaculans* et *B. thermosphacta*. En dessous de ce noyau principal dominant, un ensemble de 13 OTU sous-dominants a également été détecté à des abondances relatives plus faibles et à une fréquence de détection plus modérée (> 30 % des échantillons). Nous avons observé que (1) le taux de population des espèces du noyau principal est moins affecté par le type de conditionnement que par la réduction de la teneur en sel, (2) l'effet de ces deux facteurs était espèce-dépendant et (3) la réduction de la teneur en

sel induisait plus de changement d'abondance (diminution de l'abondance) dans le noyau sous dominant que le type de conditionnement.

Ces résultats démontrent que la réduction de la teneur en sel n'affecte pas la richesse bactérienne des chipolatas altérées, mais entraine un déséquilibre d'abondance entre les différentes espèces bactériennes et notamment entre les espèces majoritaires appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* et celles de la famille des *Enterobacteriaceae* minoritaires.

5.2.4. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Applied and Environmental Microbiology

Reducing Salt in Raw Pork Sausages Increases Spoilage and Correlates with Reduced Bacterial Diversity

Lysiane Fougy,[a,b] Marie-Hélène Desmonts,[b] Gwendoline Coeuret,[a] Christine Fassel,[b] Erwann Hamon,[b] Bernard Hézard,[b] Marie-Christine Champomier-Vergès,[a] Stéphane Chaillou[a]

Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France[a]; Aérial, Parc d'Innovation, Illkirch, France[b]

ABSTRACT

Raw sausages are perishable foodstuffs; reducing their salt content raises questions about a possible increased spoilage of these products. In this study, we evaluated the influence of salt reduction (from 2.0% to 1.5% [wt/wt]), in combination with two types of packaging (modified atmosphere [50% mix of CO_2-N_2] and vacuum packaging), on the onset of spoilage and on the diversity of spoilage-associated bacteria. After 21 days of storage at 8°C, spoilage was easily observed, characterized by noticeable graying of the products and the production of gas and off-odors defined as rancid, sulfurous, or sour. At least one of these types of spoilage occurred in each sample, and the global spoilage intensity was more pronounced in samples stored under modified atmosphere than under vacuum packaging and in samples with the lower salt content. Metagenetic 16S rRNA pyrosequencing revealed that vacuum-packaged samples contained a higher total bacterial richness ($n = 69$ operational taxonomic units [OTUs]) than samples under the other packaging condition ($n = 46$ OTUs). The core community was composed of 6 OTUs (*Lactobacillus sakei*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Serratia proteamaculans*, and *Brochothrix thermosphacta*), whereas 13 OTUs taxonomically assigned to the *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, and *Leuconostocaceae* families comprised a less-abundant subpopulation. This subdominant community was significantly more abundant when 2.0% salt and vacuum packaging were used, and this correlated with a lower degree of spoilage. Our results demonstrate that salt reduction, particularly when it is combined with CO_2-enriched packaging, promotes faster spoilage of raw sausages by lowering the overall bacterial diversity (both richness and evenness).

IMPORTANCE

Our study takes place in the context of raw meat product manufacturing and is linked to a requirement for salt reduction. Health guidelines are calling for a reduction in dietary salt intake. However, salt has been used for a very long time as a hurdle technology, and salt reduction in meat products raises the question of spoilage and waste of food. The study was conceived to assess the role of sodium chloride reduction in meat products, both at the level of spoilage development and at the level of bacterial diversity, using 16S rRNA amplicon sequencing and raw pork sausage as a meat model.

Traditional French raw pork sausages are made of a complex assortment of ingredients: pork meat, pork fat, spices, sugars, antioxidants, and sodium chloride, and they are stuffed in natural casing. From pork slaughtering to final packaging, their manufacture requires several steps (meat cutting, blending, and stuffing), with each a potential source of bacterial contamination (1–3). Raw pork sausages are thus very sensitive to spoilage unless specific treatments are applied to prevent their rapid sensory degradation. The preservation of this type of meat product, whose common shelf life ranges from 2 to 3 weeks, can only be ensured by a combination of several factors (the hurdle technology concept [4]). These include low storage temperature (<8°C), CO_2-enriched atmosphere packaging, and the use of preservative ingredients, such as salts.

Sodium chloride (NaCl) is the most commonly used ingredient in raw pork sausages because it improves texture, enhances both flavors and taste, and lowers the water activity (a_w) (5). The lowering of a_w usually reduces the growth capacity of many bacterial species and consequently increases safety of the food product (6). However, excessive daily sodium intake in the diet can have harmful health effects, particularly by accentuating hypertension, the major risk factor for cardiovascular disease (7). While in 2003, a World Health Organization report (8) recommended limiting daily salt consumption to 5 g, in France, for example, the average consumer intake is still twice this suggested amount (9).

As processed meats contribute significantly to daily salt, and especially sodium, intake (10), salt reduction has become a major issue for the meat industry. In order to implement sodium reduction strategies, this industry needs to anticipate the safety and sanitary consequences of such a reduction and thus, specifically, evaluate the potential effects of sodium chloride reduction on the diversity and growth dynamics of spoilage-causing microbial ecosystems.

Meanwhile, while numerous studies have addressed the impact

Received 29 January 2016 **Accepted** 17 April 2016

Accepted manuscript posted online 22 April 2016

Citation Fougy L, Desmonts M-H, Coeuret G, Fassel C, Hamon E, Hézard B, Champomier-Vergès M-C, Chaillou S. 2016. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity. Appl Environ Microbiol 82:3928–3939. doi:10.1128/AEM.00323-16.

Editor: T. E. Besser, Washington State University

Address correspondence to Stéphane Chaillou, stephane.chaillou@jouy.inra.fr.

Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00323-16.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

of salt on the growth potential of meat-borne bacteria (see reference 6) by measuring growth parameters in meat models (11) or by using mathematical modeling (12, 13), very few studies addressing the impact of salt reduction on the diversity and structure of bacterial communities are available. For example, the most recent works have focused on the reduction in growth of bacterial pathogens (14, 15) or on the numeration of spoilage bacteria using either conventional culture media or low-resolution nonculturing techniques, such as denaturing gradient gel electrophoresis (16–18). According to these studies, salt reduction is associated with faster meat spoilage, but the impact of salt reduction on the meat microbiota is not so clear. Depending on the degree of salt reduction, bacterial populations may remain quite stable, sometimes even with a decreased incidence of bacteria that cause meat spoilage (17). Furthermore, food microbiologists have recently highlighted the weaknesses of plating methods in assessing the overall diversity of potential meat spoilers (1, 2, 19–21), in that the most abundant (often psychrotrophic) species are among the hardest to cultivate using conventional media. If the effect of salt reduction on the meat microbiota is to be thoroughly assessed, it is necessary to analyze the whole bacterial community, as the meat microbiota is often divided into a core dominant population and a product-specific subdominant population (20). Variations in these complex microbial assemblages can result in different forms and degrees of spoilage (22–24).

Toward this end, two culture-independent analyses of raw or cooked pork sausages were recently published. Benson and coworkers (25) revealed complex dynamics of about 20 taxa during the storage of raw pork sausages at 4°C. This study also illustrated the role of spices as a source of spoiling bacterial species and demonstrated the important role of sodium- and acid-based preservatives (sodium lactate and sodium diacetate), first, in reducing spoilage of sausages, and second, in hindering the growth of the dominant spoilage bacteria *Lactobacillus graminis* and *Carnobacterium divergens*. More recently, Hultman and coworkers (2) showed that contamination during the initial preparation of cooked sausages is a key point that can influence spoilage dynamics during storage. However, they also underlined the importance of temperature and other conditions during distribution and storage in influencing the rate of spoilage.

Despite this progress, the following question remains open: following initial contamination, what is the real impact of salt reduction on meat bacterial diversity in the absence of acid-based preservatives, and how does this reduction influence the intensity of spoilage? We aimed to address this question using homemade raw pork sausages as a meat model. We measured the influence of a 25% sodium chloride reduction (from 2.0% [wt/wt] to 1.5% [wt/wt], according to European rule recommendations [26]), on both the diversity of spoilage bacteria (using a combination of quantitative PCR and pyrosequencing of the 16S rRNA gene) and on spoilage (using sensory analysis). This investigation was carried out using two different packaging systems commonly used on the market: (i) modified atmosphere packaging (MAP) made of 50% CO_2 and 50% N_2, and (ii) vacuum packaging (VPA).

MATERIALS AND METHODS

Sausage manufacturing, packaging, and storage conditions. Fresh raw pork meat (post-rigor mortis meat) was collected from a single wholesaler and prepared in a pilot industrial laboratory. After cutting, the meat was coarsely minced and cured with a mix of spices (black and white pepper, nutmeg, garlic, and hot chili) and other ingredients (0.9% [wt/wt] glucose syrup, 0.052% [wt/wt] dextrose, 0.040% [wt/wt] ascorbic acid, and 0.015% [wt/wt] sodium ascorbate, with carmine used as red dye). Sodium chloride was added, according to the experimental conditions tested at 1.5% or 2% (wt/wt) and was confirmed by sodium assay (Larebron, Illkirch, France). Next, the mixture was stuffed (Mod 7/V; Tre spade, Turin, Italy) into desalted sheep's casings.

Around 200 g of sausages (corresponding to one unique sausage for each sample) was packed using either MAP, which was a mixture of 50% CO_2 and 50% N_2 (X50S Freshline; Air Products, Aubervilliers, France), or VPA (MBT-18; Multivac, Lagny-sur-Marne, France) into multilayer polyamide and polyethylene bags (product no. 10702055; Cenpac, Roissy-en-France, France) whose oxygen permeability is 35 $cm^3/m^2 \cdot day \cdot 10^5$ Pa (at 23°C and 0% relative humidity [rH]). Samples were then stored at 8°C for 21 days (usual use-by date). The control samples were immediately frozen and stored at −20°C. For each experimental condition, four samples were analyzed after storage: three for physicochemical, sensory, and microbiological analysis, and one for molecular bacterial diversity analysis by pyrosequencing and quantitative PCR. Five independent biological replicates were analyzed (named B04, B05, B06, B08, and B10), and the data set contained 80 samples (4 experimental conditions × 4 samples/condition × 5 independent replicates), with 60 samples used for sensory analysis and 20 samples used for bacterial diversity analysis.

Spoilage characterization. The sensory characteristics of spoiled sausages were described after 21 days of storage at 8°C (time T_a) in comparison with control samples (fresh samples stored 21 days at −20°C). Visual spoilage evaluation was first based on visual color changes (confirmed by chromametric measurements), the production of exudate, and the presence of swelling in the packaging or casing (CO_2 production measured by gas analysis). Immediately after the bags were opened, spoilage was smelled by a jury of four trained persons. For the smelling, all jurors choose freely the terms to describe the spoiled samples, all terms were gathered by the four members, and the jury discussed the use of the most appropriate or more general terms. The jurors then assigned a spoilage value, a unique spoilage value for one sample. The spoilage scale ranges from 1 to 5, with a value of zero being reserved for unspoiled samples. Intermediate values of 0.5 or 1.5 were attributed to the batches in case of important variations between the samples.

For each MAP sample, O_2 and CO_2 levels (PAK12P; Abiss, Chatillon, France) in the packaging were measured two times: 1 day after packaging, in order to estimate CO_2 absorption by the meat, and once at spoilage time (T_a). For each sample, pH was measured (pH 213; Hanna Instruments, Tanneries, France) from 10 g of sausages that were homogenized in 10 ml of distilled water, according to ISO standard 2917:1999 (27). For each sample, the exudate was weighed and reported in proportion to the initial weight of the whole sausage. The color of the samples was measured by chromametric measurements (CR100; Minolta, Carrières-sur-Seine, France) performed at the surface of the spoiled sausages. The color coordinates L* (lightness), a* (red/green opponent colors), and b* (yellow/blue opponent colors) were recovered. Five measurements were performed on each of 12 samples. The results were expressed as a difference between the analyzed sample and the control fresh sample (e.g., $\Delta L^* = L^*_{analyzed} - L^*_{control}$).

Microbiological analysis. Total viable counts were estimated from 25 g of each spoiled sausage sample after homogenization in 225 ml of peptone water (catalog no. CM 0509B; Oxoid, Dardilly, France) in a stomacher (AES Chemunex, Marcy l'Etoile, France). Dilutions were plated on tryptone soya agar (catalog no. P05012A; Oxoid) and on de Man, Rogosa, and Sharpe agar (catalog no. CM0361B; Oxoid) and incubated for 72 h at 30°C to estimate the total aerobic mesophilic population and the mesophilic lactic acid bacteria population size in CFU g^{-1} of meat, respectively. The psychrotrophic lactic acid bacterium population was determined on MRS agar and incubated for 7 days at 15°C.

Bacterial DNA extraction. Ten grams of meat was homogenized in 40 ml of sterile ultrapure water with 1% Tween 80 (catalog no. 278630010;

Acros Organics, Waltham, MA, USA) for 30 s in a stomacher. Then, 32 ml of the shreds was collected and centrifuged at 500 × *g* for 3 min at 4°C (5804R; Eppendorf, Montesson, France) to spin down the meat fibers. The clean supernatant (25 ml) was collected and centrifuged at 3,000 × *g* for 5 min at 4°C to spin down the bacterial cells. The cell pellet obtained was washed in 1 ml of sterile ultrapure water and collected after centrifugation at 3,000 × *g* for 5 min at 4°C.

Bacterial DNA was extracted with the NucleoSpin tissue kit (Macherel Nagel, Hoerdt, France), in accordance with the manufacturer's instructions, and resuspended in 100 μl of BE buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8.5]). DNA samples were then stored at −20°C.

Barcoded-amplicon pyrosequencing. For each sample, barcoded pyrosequencing of the 16S rRNA V1 to V3 region was performed using 27F and 534R universal primers, as described by Chaillou et al. (20). Ten nanograms of DNA was used as the PCR template, and PCR bias was minimized with the following cycling conditions: a temperature gradient (60°C to 0.5°C/cycle) and 25 cycles, as described by Barott et al. (28). Three independent PCRs were performed per sample. Each PCR product was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Finally, the three PCR products were pooled in equimolar quantity and checked for quality on a DNA7500 chip (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Amplicons were pyrosequenced from the forward A-side with 454 GS FLX++ Titanium technology (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) at an approximate scale of 15,000 reads per sample.

OTU-based microbial diversity analysis and bioinformatic data analysis. The raw pyrosequencing reads were filtered using the Prinseq tool (29), with the following options: no ambiguous N; length between 350 and 650 bp; minimum quality score of 10, and an average quality score of ≥20; quality trimming at the 3′ end with a score of <25 and at position 50; and a sliding window size of 4 to calculate the quality score. Quality-filtered reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) using the RDP aligner tool (https://pyro.cme.msu.edu/index.jsp) (30), with a similarity value of 98%. Then, chimeric OTUs were detected using the online DECIPHER software (http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html) (31) and subsequently excluded. An additional step of OTU removal was carried out by filtering low-abundance ($<5 \times 10^{-5}$) OTUs, which are likely to belong to artifact abundant species (32–34). This process removed 75% of spurious OTUs but kept 99.5% of all reads. Taxonomic assignment of the filtered OTUs was carried out by a BLASTn alignment to the nonredundant (nr99) version of the LTP-version 111 Silva (35) database (http://www.arb-silva.de), as described by Chaillou et al. (20). In parallel, a second taxonomic assignment (98% identity) was performed for OTUs with no match in the LTP-version 111 database using the SINA aligner of the SILVA database (36) and the uncultured EzTaxon database (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon) (37) as a control. Finally, to validate the quantification of the relative abundance of the OTUs present in each sample, reads from the corresponding sample were aligned to the 78 representative OTUs resulting from the present study, as previously described by Chaillou et al. (20), and an abundance matrix was built (see Data Set S1 in the supplemental material). To compare the relative abundances of the OTUs, reads were then normalized to the median value of the total reads (as described by Chaillou et al. [20]), and the relative abundance values were subjected to a $\log_{10}$ transformation. The Chao1 diversity estimator (38) was calculated in an Excel spreadsheet using the abundance table. Bacterial evenness was estimated for each sample using a set of core species (species present in all samples analyzed; see Results). This evenness value was calculated using R statistical software, version 3.1.2 (39), and corresponded to the median value of all $\log_{10}$ differences between the most abundant OTU and all other subdominant OTUs in the set of core species ($N_{max} - N_i$), where N_{max} was the $\log_{10}$ number of reads from the most abundant OTU, and N_i was the $\log_{10}$ number of reads from each of *i* subdominant species. Box-and-whisker plots and bar plots were constructed with the UsingR package of R, version 2.0.5 (40), and violin plots were constructed with the R ggplot2 package, version 1.0.1 (41).

Quantitative PCR. A set of 18 species was selected for real-time quantitative PCR. For that purpose, 23 pairs of primers were designed to target either species- or genus-specific amplification, as described in Table 4. All real-time PCR amplifications were performed as described in reference 42. Briefly, the reaction mixture contained 5 μl of total bacterial genomic DNA (diluted 10-fold to allow sufficient removal of inhibitor effects) with 15 μl of a reaction mixture containing 10 μM each primer (forward and reverse), 10 μl of SYBR Mesa green master mix reagent (Eurogentec, Liège, Belgium), and 4.2 μl of sterile water. Each PCR run included a positive-control DNA sample (isolated from type strains) and a no-template control. The initial step of quantitative PCR (qPCR) amplification was one cycle at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The step for melting curve checking was performed at 95°C for 15 s, 1 min at 60°C, and 20 min ramping from 60°C to 95°C. Each sample was quantified in duplicate, and the average threshold cycle (C_T) was calculated. To estimate the population level of the target bacteria in spoiled sausages in CFU g^{-1} of meat, two types of equations were used, depending on whether the gene probe was based on 16S rRNA gene or on another housekeeping gene (see Fig. S1b and Table S1c in the supplemental material). These equations were obtained after three independent biological replicates of calibration curves, which were carried out as described by Chaillou et al. (42).

Microarray data accession numbers. The raw FastQ data have been deposited in the ENA database (http://www.ebi.ac.uk/ena) with the accession numbers ERS937270 to ERS937289, corresponding to BioProject no. PRJEB9493.

RESULTS

Study design. Our aim was to compare the influence of sodium chloride (NaCl) reduction, under two packaging conditions, on the degree of spoilage and the bacterial diversity of raw pork sausages. For that purpose, a square matrix of four experimental conditions was designed, which included two concentrations of NaCl (2.0% [wt/wt] and 1.5% [wt/wt]) and two packaging conditions (modified atmosphere packaging [MAP; 50% CO_2 and 50% N_2] and vacuum packaging [VPA]). The microbiological variability of the raw meat was assessed by analyzing five independent replicates (i.e., five different meat batches, with fresh meat for each batch, were prepared and analyzed over a period of 4 months in 2014). In all, 20 sets of meat (5 batches × 4 experimental conditions) were investigated. For each set, fresh samples (T_0) were kept at −20°C and used as controls for sensory analysis (nonspoiled sausages). Samples for spoilage analysis (T_a) were stored at 8°C for 21 days (use-by date).

Salt reduction is associated with acid and exudate production. Physicochemical parameters (pH, CO_2, O_2, exudate production, and chromametric measurements) of the various samples are shown in Table 1 and were used in a principal-component analysis in order to differentiate among spoiled samples (Fig. 1). The samples could be discriminated based on sodium chloride concentration but not on the type of packaging atmosphere. Samples with a lower sodium chloride concentration showed a higher degree of spoilage, which correlated with both higher exudate production (1.48% ± 0.78% versus 0.20% ± 0.23% [wt/wt] in 1.5% and 2.0% [wt/wt] NaCl, respectively) ($P < 0.0006$, two-tailed *t* test) and slightly lower pH (5.04 ± 0.35 versus 5.30 ± 0.30 in 1.5% and 2.0% [wt/wt] NaCl, respectively); these two parameters were correlated ($R^2 = -0.376$, $P = 0.102$).

Other physicochemical parameters had less discriminatory power, although noticeable graying (loss of red, negative Δa*) and bleaching (positive ΔL*) were observed in all spoiled samples (with the exception of batch B05, which was not grayed). Further-

TABLE 1 Physicochemical parameters of spoiled sausages

Batch name (packaging_salt[a])	Sodium content (mg/100 g)	Estimation of NaCl content (%)[b]	Exudate (% [wt/wt])	pH	ΔL*[c]	Δa*[d]	Δb*[e]	Residual O_2 (%)	Residual CO_2 (%)
MAP_15	611 ± 20	1.55 ± 0.05	0.93 ± 0.75	5.07 ± 0.37	1.7 ± 4.0	0.7 ± 3.6	0.3 ± 1.5	1.0 ± 0.9	32.7 ± 9.2
MAP_20	829 ± 14	2.11 ± 0.04	0.08 ± 0.19	5.31 ± 0.33	−0.1 ± 3.5	1.1 ± 3.9	−0.3 ± 0.8	1.2 ± 1.5	28.9 ± 11.1
VPA_15	611 ± 20	1.55 ± 0.05	2.03 ± 0.82	5.01 ± 0.34	1.2 ± 4.3	0.5 ± 3.4	0.2 ± 2.1	ND[f]	ND
VPA_20	829 ± 14	2.11 ± 0.04	0.26 ± 0.41	5.27 ± 0.30	−0.1 ± 3.4	0.6 ± 4.2	−0.2 ± 3.0	ND	ND

[a] MAP, modified atmosphere packaging; VPA, vacuum packaging. For salt concentrations: 15, 1.5% NaCl; 20, 2.0% NaCl.
[b] NaCl = 2.54 × Na (MM_{Na} = 23 g mol^{-1}, MM_{Cl} = 35.5 g mol^{-1}, MM_{NaCl} = 58.44 g mol^{-1} [where MM is molecular mass]; m_{NaCl} = 58.44/23 × m_{Na} [where m is mass]).
[c] ΔL*, difference between spoiled and fresh samples; ΔL* tends to be positive, indicating that spoiled samples were clearer (see Materials and Methods).
[d] Δa*, difference between spoiled and fresh samples; Δa* tends to be negative, indicating that spoiled samples had lost red intensity.
[e] Δb*, difference between spoiled and fresh samples; Δb* tends to be negative, indicating that spoiled samples had lost yellow intensity.
[f] ND, not determined. Gas composition in VPA samples could not be taken.

more, in three MAP sample sets (MAP_B08_15, MAP_B10_15, and MAP_B10_20), swelling was observed; this correlated with an increase of about 80% in CO_2 levels, at 44.6% ± 6% CO_2 versus a normal content of 24.8% ± 4%.

Production of off-odors is packaging dependent. Correspondence factorial analysis was performed in order to correlate off-odor type with experimental conditions (Fig. 2). This analysis revealed that the type of packaging atmosphere strongly changed the nature of spoilage odors (principal component, >90%). Rancid off-odors were mainly associated with VPA, while sour off-odors were largely linked with MAP. Furthermore, the combination of MAP and low sodium chloride concentration (1.5% NaCl) also correlated with the detection of sulfurous off-odors, whereas the combination of 2% NaCl with VPA storage gave a sensory odor analysis close to that of the control (nonspoiled) samples. In addition, during the sensory analysis, the panelists assessed the spoilage odor intensity and attributed to each sample a value ranging from 0 to 5 (Table 2 and Materials and Methods). A distribution of these values for the 20 sample sets among the four experimental conditions is shown in Fig. 3. Both packaging atmosphere conditions and sodium chloride concentration mediated changes in spoilage intensity. The general trend was a gradient, with spoilage intensity being stronger both with sodium chloride reduction and under MAP versus VPA storage conditions.

Differences in types and degrees of spoilage do not correlate with concentration of culture-dependent bacteria. The total population of cultivable microorganisms in all spoiled sausages ranged from 8.08 ± 0.31 to 9.17 ± 0.19 log_{10} CFU g^{-1} of meat, and there was no difference associated with either sodium chloride reduction or the type of packaging atmosphere (Table 3). Therefore, variations in spoilage intensity could not be correlated to the overall bacterial load after 21 days of storage. Additionally, the

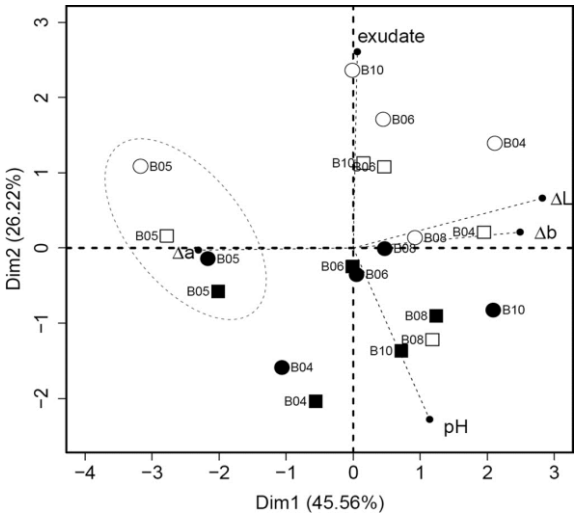


FIG 1 Principal-component analysis (PCA) based on physicochemical parameters (pH, production of exudate, and meat color components Δa*, Δb*, and ΔL*) of spoiled sausages at T_a (21 days). The plot shows the discrimination of samples based on salt content. MAP samples are depicted with squares, VPA with circles, 1.5% salt is in white, and 2% salt is in black. Samples from the same meat batch are marked with the same batch number (from B04 to B10). The main effect of variables is shown in the thin dashed lines. It clearly shows that the most influent variable is salt content (45.56%), with a higher production of exudate and lower pH in 1.5% samples than in 2% samples. The proportion of variance explained by each axis is shown.

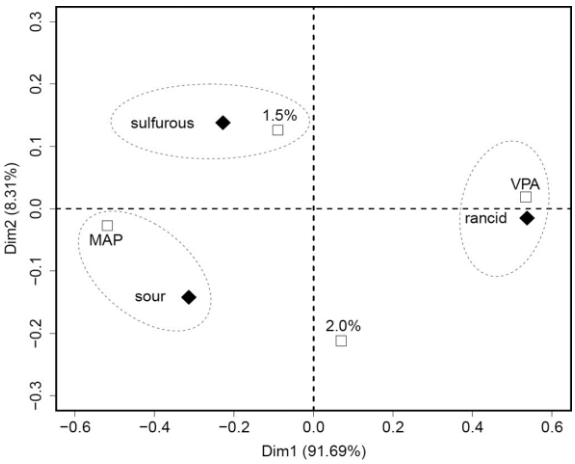


FIG 2 Correspondence factorial analysis (CFA) showing the relationship between off-odors (◆) identified in spoiled sausages and experimental conditions (□). This analysis distinguishes off-odors of samples, according to the experimental conditions (n = 10 per condition). Samples with 2% NaCl were not associated with an off-odor; they were close to the control samples.

TABLE 2 Sensory parameters of spoiled sausages

Batch name (packaging_batch no._salt[a])	Off-odor(s)	Spoilage sensory intensity (0 to 5)[b]
MAP_B04_15	Sulfurous	4
MAP_B05_15	Sulfurous, sour	2.5
MAP_B06_15	Sulfurous	1.5
MAP_B08_15	Sulfurous, sour	2
MAP_B10_15	None	1
MAP_B04_20	Sour	1.5
MAP_B05_20	Sulfurous, sour	1.5
MAP_B06_20	None	0
MAP_B08_20	Sour, rancid	1
MAP_B10_20	None	1.5
VPA_B04_15	Sulfurous, sour	3
VPA_B05_15	Rancid	2
VPA_B06_15	Rancid	0.5
VPA_B08_15	Sour, rancid	1.5
VPA_B10_15	Sulfurous, rancid	2
VPA_B04_20	Sulfurous	2
VPA_B05_20	Rancid	1
VPA_B06_20	Rancid	1
VPA_B08_20	Rancid	0.5
VPA_B10_20	None	1

[a] MAP, modified atmosphere packaging; VPA, vacuum packaging. For salt concentrations: 15, 1.5% NaCl; 20, 2.0% NaCl.
[b] Spoilage sensory intensity on a scale from 0 (fresh meat) to 5 (strongly spoiled) (see Materials and Methods).

TABLE 3 Bacterial enumeration and OTU richness in spoiled sausages

Batch name (packaging_salt[a])	Total viable population of cultivable microorganisms (CFU g^{-1} of meat) at[b]: T_0	T_a	No. of OTUs
MAP_15	4.23 ± 0.51	8.55 ± 0.41	14 ± 3
MAP_20	4.09 ± 0.38	8.65 ± 0.36	18 ± 5
VPA_15	4.23 ± 0.51	8.57 ± 0.38	22 ± 7
VPA_20	4.09 ± 0.38	8.55 ± 0.34	23 ± 8

[a] MAP, modified atmosphere packaging; VPA, vacuum packaging. For salt concentrations: 15, 1.5% NaCl; 20, 2.0% NaCl.
[b] Bacterial enumeration on tryptone soya agar plates (see Materials and Methods). The results on MRS agar (incubated at 30°C and 15°C) were not different, so they are not presented.

bacterial concentration measured in fresh T_0 samples, which ranged from 3.64 ± 0.15 to 4.85 ± 0.18 $\log_{10}$ CFU g^{-1} of meat, was not linked with either of the two factors (Table 3).

VPA storage and high salt concentration maintain higher bacterial richness. Next, we sought to describe the bacterial diversity of spoiled sausages using a nonculturing analysis, in particular, with pyrosequencing of the 16S rRNA V1 to V3 region. Each of the 20 sample sets was sequenced at a scale of ~15,000 reads per sample. In the whole data set, a total of 387,111 bacterial 16S rRNA sequences were analyzed (average number of reads, 17,819 ± 2,227 and average sequence length, 549 bp ± 10 bp). The rarefaction analysis is shown in Fig. S1a in the supplemental material and revealed satisfactory sequencing coverage for most of the samples. These reads were binned to a 98% identity threshold,

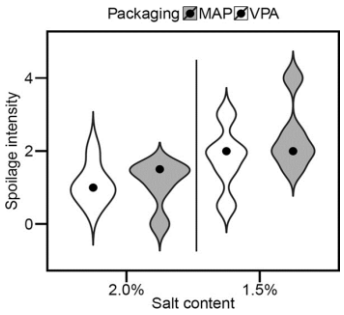


FIG 3 Violin plot showing the gradient of spoilage intensity (aspect and off-odors) of spoiled sausage on a scale from 0 to 5, according to the salt content (x axis) and the packaging condition (MAP samples in gray and VPA in white). The shape of each plot reflects its distribution density. The black circles represent the median value of spoilage intensity for each condition ($n = 5$).

as suggested by Kim et al. (43); after removal of chimeras and low-frequency binning clusters, we characterized 78 different species- or species/clade-level (groups of closely related species) operational taxonomic units (OTUs). The abundance table can be found in Data Set S1 in the supplemental material.

A comparative analysis of bacterial richness (total number of different OTUs), illustrated in Fig. 4A, revealed that samples that were stored under VPA conditions had significantly ($P < 0.02$, two-tailed t test) higher richness than those stored under MAP conditions, with an average of 22 ± 6 OTUs versus 16 ± 4 OTUs, respectively. In addition, the overall richness in all VPA samples was ~50% higher ($n = 69$ versus $n = 46$ OTUs) than in all MAP samples. As shown in Fig. 4B, >80% of the OTUs in MAP samples belonged to only three bacterial orders (*Lactobacillales*, *Enterobacteriales*, and *Bacillales*), but a more diverse range of bacterial taxa was represented by the OTUs in VPA samples. This richness was, however, mostly influenced by OTUs from the subdominant population. Rarefaction curves shown in Fig. S1a in the supplemental material also indicate that higher sequencing coverage could still increase the bacterial richness in some of the VPA samples. To confirm these results, we calculated the Chao1 index (S*1), a statistical estimator that describes a predictive richness based on the number of singletons or doubletons (i.e., the subdominant population) detected per sample (38). The difference in Chao1 estimations between VPA and MAP samples, at 33.1 ± 13.1 versus 19.4 ± 6.7 OTUs, respectively, was larger than that observed between the numbers of OTUs (see above). In other words, the increased diversity of subdominant OTUs in VPA samples led to a larger difference between the Chao1 value and the number of observed OTUs in that packaging condition than was found in MAP samples, for which there was little difference between these two metrics. When a similar comparative analysis of bacterial richness was performed on samples with differing sodium chloride concentrations, we observed a higher maintained richness at the 2.0% than the 1.5% salt concentration, although it was not statistically significant.

Salt reduction modifies the subdominant population with a species-dependent effect. We identified around 20 OTUs that constituted the conserved bacterial community of spoiled raw sausages (sum of reads, >100 across samples; prevalence, at least 30%). The highly prevalent and dominant core was composed of six OTUs (OTUs conserved in 90% of all samples), which were taxonomically assigned to *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Ser-*

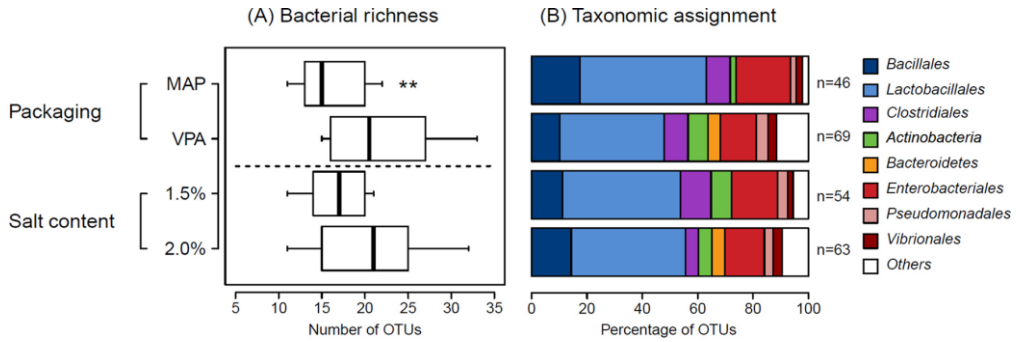


FIG 4 (A) Box plot showing the average number of OTUs (bacterial richness) identified in spoiled sausages according to salt content and packaging conditions (all samples combined). In the plots are marked the median (bold line) and the interquartile range (box) between the first and the third quartiles obtained from the 10 samples for each condition. Asterisks indicate that samples deviated significantly from the average ($P < 0.02$, two-tailed *t* test). (B) Bar plots representing the taxonomic assignments of OTUs according to salt content and packaging conditions. The total number of OTUs for all samples under each condition is indicated on the right of the bar plot. Only the most dominant bacterial orders obtained in this study are specifically indicated; others are grouped in "Others."

ratia proteamaculans genotypic clade (including *S. grimesii*, *S. plymuthica*, and *S. quinovorans*) and *Brochothrix thermosphacta*. Considering the whole data set, *L. sakei* was the most abundant species. However, *L. sakei* was the most dominant only in two meat batches (samples from batches 04 and 05) and was slightly outcompeted either by *L. piscium* in samples of batch 06, *Lactobacillus algidus* (four samples from batch 10), or *Weissella viridescens* (sample MAP_B08_15, from batch 08). The high abundance of *L. algidus* and *W. viridescens* was associated with higher CO_2 concentrations in the MAP samples. However, these two bacterial spoilers were present at a low frequency, as they were undetected in 10 and 13 samples out of 20, respectively. Below the core dominant group, a set of 13 subdominant OTUs was also detected with moderate frequency (>30% of samples) but with lower relative abundance. These included OTUs assigned to *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fuchuensis*, and *Lactobacillus oligofermentans*), *Enterococcaceae* (*Enterococcus avium*, *Enterococcus durans* genotypic clade [including *E. hirae* and *E. lactis*], and *Vagococcus fluvialis*), *Leuconostocaceae* (*Leuconostoc carnosum* and *Leuconostoc citreum*), and *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter youngae* genotypic clade [including *C. gilleni* and *C. braakii*], *Enterobacter kobei* genotypic clade [including *E. mori*, *E. ludwigii*, *E. cloacae* subsp. *cloacae*, and *Pantoea agglomerans*], *Gibbsiella quercinecans*, *Lelliottia amnigena*, and *Yersinia kristensenii*).

A set of nine quantitative PCR gene probes was then chosen or designed (Table 4; see also Fig. S1b in the supplemental material) in order to quantify the bacterial concentration of most of the OTUs present in the dominant and subdominant core community. Except for *Serratia proteamaculans*, which was underestimated in the pyrosequencing analysis, we found a strong linear relationship between the relative abundance (number of reads) obtained from pyrosequencing and the population level, as determined by qPCR; we used linear regression in order to convert relative read counts into an extrapolated estimation of the population level in cells per gram of meat for all OTUs (see Fig. S1e in the supplemental material). The results are shown in Fig. 5.

We observed that (i) the abundance of core dominant species was less affected by the type of packaging or by the sodium chloride concentration than that of the subdominant species, (ii) the effects of the two factors (sodium chloride and packaging) on abundance were strongly species dependent, and (iii) the reduction in sodium chloride concentration induced more changes in abundance than did differences in packaging type.

Among the species whose populations significantly changed, several effect classes could be identified. The first class (A) included only *L. carnosum/L. citreum*. Although present at a subdominant level (average, ~4.5 $\log_{10}$ cells g^{-1} of meat), it had an increased population both upon sodium chloride reduction and when MAP packaging was used (this experimental condition showed the highest degree of spoilage on average; Fig. 3). The second class (B) included mainly *B. thermosphacta* and, to a lesser extent, *L. oligofermentans*; these species exhibited the opposite reaction to sodium chloride reduction (decrease in population) and to MAP packaging (increase in population). Concerning this class, we noticed that samples from batch 05 that demonstrated less graying (Fig. 1) were also characterized by a high abundance of *L. oligofermentans*, regardless of salt or packaging conditions. Finally, the third class (C) included OTUs belonging to *Enterococcaceae* and *Enterobacteriaceae*, in particular the species *Serratia proteamaculans*, which showed a significant increase in population at the high sodium chloride concentration and under VPA storage conditions.

Salt reduction induces a loss of bacterial evenness. Together with the measure of bacterial richness (the number of taxa), the measure of bacterial evenness (distribution of abundance among taxa) is an important criterion in beta-diversity analysis. The fact that the subdominant communities observed in raw pork sausage samples showed an increase in population in the VPA-2.0% salt condition, and that this correlated with the lowest degree of spoilage on average (Fig. 3), suggests the possible involvement of bacterial evenness in decreasing the spoilage of raw pork sausages. This observation prompted us to compare, for the samples, the average differences in population found between the most dominant species and other subdominant species. However, at low levels of bacterial richness (~20 taxa), many evenness indices (e.g., Shannon-Weaver) lack sensitivity (44). Therefore, to measure evenness, we simply calculated for each sample the mean difference in abundance between the dominant species and all sub-

TABLE 4 Descriptions of genus- or species-specific primers used for quantitative PCR detection of target species in meat

Primer pair	Target species (target gene)	Strain used in calibration	Sequence (5′–3′)	Amplicon size (bp)	Annealing temp (°C)	Reference or source
Based on 16S rRNA gene						
QSF01-ACI-F	*Acinetobacter* spp. (16S)	*Acinetobacter calcoaceticus* CIP 81.8	GAAGCTAGAGTATGGGAGAGGA	108	55	This study
QSF01-ACI-R			GTCAGTATTAGGCCAGATGGCT		55	
QSF01-BTH-F	*Brochothrix* spp. (16S)	*Brochothrix thermosphacta* 160x8	ACGAACGGATAAAGAGCTTGCTCTTTTG	158	58	This study
QSF01-BTH-R			CGAAACCGTCTTTCACTTGAACATCTTAT		57	
QSF01-CAR-F2	*Carnobacterium* spp. (16S)	*Carnobacterium divergens* MFPC19D14-04	CTGCCCATAAGAGGGGGATAACATTC	104	59	This study
QSF01-CAR-R2			ATCCATAAGTGGTAGCCGAAGCCAC		60	
QSF01-HAL-F	*Hafnia/Obesumbacterium* spp. (16S)	*Hafnia alvei* CIP 57.31	TAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGTC	110	59	This study
QSF01-HAL-R			CGCCACTGGTGTTCCTCCAGATC		61	
QSF01-LCN-F2	*Leuconostoc* spp. (16S)	*Leuconostoc mesenteroides* MFBP17A13-01	GTGAAAGCCCGGAGCTCAACTC	118	59	This study
QSF01-LCN-R2			CTGGTGTTCTTCCACATATCTACGCATTC		60	
QSF01-LIS-F	*Listeria* spp. (16S)	*Listeria innocua* CIP 80.11	CTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTC	170	57	This study
QSF01-LIS-R			GCTATGCATCGTTGCCTTGGTAG		57	
QSF01-PSD-F	*Pseudomonas* spp. (16S)	*Pseudomonas fragi* K1	GGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG	100	60	This study
QSF01-PSD-R			GTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCG		59	
QEBP01-SER-F	*Serratia* spp. (16S)	*Serratia proteamaculans* CIP 103236	CTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC	280	57	This study
QEBP01-SER-R			CCGTCAATGCAATGTGCTATTAACAC		56	
QSF01-WVI-F	*Weissella* spp.(16S)	*Weissella viridescens* CIP102810	TTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCA	170	58	This study
QSF01-WVI -R			GACCATCTCTTAGTGATAGCAAGACCAT		58	
Based on single-copy gene						
QSF03-BTH-F	*B. thermosphacta* (*rpoC*)	*B. thermosphacta* 160x8	GGACCAGAGGTTATCGAAACATTAACTG	148	58	This study
QSF03-BTH -R			TAATACCAGCAGCAGGAATTGCTT		54	
QPVS05-CDI-F2	*C. divergens* (*rpoA*)	*C. divergens* MFPA43A14-05	CTTGCATAACCTCTTCCTGATTTT	244	52	This study
QPVS05-CDI-R2			TGATGGCGTTGTTGAGGATGTAACT		56	
QPVS05-CDI-F2	*Carnobacterium maltaromaticum* (*rpoA*)	*C. maltaromaticum* DSM 20722	CTTGCATAACCTCTACCTTGTTTC	244	54	This study
QPVS05-CDI-R2			CGATGGGGTTGTAGAAGATGTGACA		58	
QPVS-ENT-F	*Enterococcus* spp. (*tuf*)	Not used in calibration	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	56	58
QPVS-ENT -R			AACTTCGTCACCAACGCGAAC		61	
QSF04-ECO-F	*Escherichia coli* (*rpoB*)	*E. coli* DH5α	GGTAGCTAAACGTGGTGGTGTC	101	57	42
QSF04-ECO-R			ATGTCGATACCTGCTTCACCCGGA		59	
QSF02-HAL-F	*Hafnia alvei* (*fusA*)	*H. alvei* CIP 57.31	ATTGGCAATTGGCGCTGAAGAAGGT	129	58	This study
QSF02-HAL-R			GCTCAGCCATATCAGCTGGGATC		59	
QCMT05-LAL-F	*Lactobacillus algidus* (*rpoA*)	*L. algidus* CIP 106688	TGTTGGTCAAAAAGATGATTATGACAAATTG	140	55	This study
QCMT05-LAL-R			AGTTCATCGGTTAAATCAACGAATAAAGT		54	

QPVS06-LCU-F	*Lactobacillus curvatus* (*katA*)	*L. curvatus* FLEC03	CTGGTAAGAAAACACCAATGATTGCG	123	56	This study
QPVS06-LCU-R			TCGTAGTTGCCTTCTTGGGTATAGAAC		58	
QMF01-F	*Lactobacillus sakei* (*katA*)	*L. sakei* 23K	CTGGCTATCCCGATACATACC	186	54	42
QMF01-R			GCATATCTTGGCTACGGGCA		54	
QCMT05-LPI-F	*Lactococcus piscium* (*rpoA*)	*L. piscium* CMTALT10	TGAAGAAAATGTCTATGGTAAATTTGTCA	140	53	This study
QCMT05-LPI -R			GAGTACACCGTCAATTTGGATGCTT		56	
QPVS05-LCA-F	*Leuconostoc carnosum* (*rpoA*)	*L. carnosum* MFPA29A14-05	GATTGATTCAGATGAGGAACGTGTT	84	54	This study
QPVS05-LCA-R			CGCACTGCTTGTAAATCAGCT		55	
QPVS05-LCI-F	*Leuconostoc citreum* (*rpoA*)	*L. citreum* MSE2	GTATCTTACTTTCATCGCTTCCG	140	53	This study
QPVS05-LCI-R			CGCCAACACAACTTTCTTAAGGTTT		55	
QPVS05-LGE-F	*Leuconostoc gelidum* (*rpoA*)	*L. gelidum* subsp. *gasicomitatum* MFPA44A14-01	AGAACGAAGCCTTGAAGTTGATA	115	52	This study
QPVS05-LGE-R			CTGCTACGGTTGCAATATGTAG		53	
QEBP02-SPR-F	*Serratia proteamaculans* (*fisA*)	*S. proteamaculans* CIP 103236	TGGCTATCGGCGCAGAAGAGAAA	130	57	This study
QEBP02-SPR-R			GTTCTTGCATATCAGCGGGGATC		57	

dominant species (see Materials and Methods). The results are shown in Fig. 6 and demonstrate unambiguously that packaging had no effect on bacterial evenness, whereas the high salt concentration (2.0%) was capable of maintaining a much higher degree of bacterial evenness and, in particular, more parity between OTUs belonging to the *Lactobacillales* order and those from the *Enterobacteriaceae* family.

DISCUSSION

The aim of this study was to identify, in cold-stored raw pork sausages, the changes in spoilage intensity and bacterial community composition induced by a 25% reduction in the standard sodium chloride concentration (2% [wt/wt] NaCl). From previous research, a reduction in sodium chloride was expected to increase spoilage. We therefore combined this analysis with a comparison of two methods of packaging: modified atmosphere (50% CO_2 and 50% N_2) and vacuum packaging. The sausages lacked any kind of preservatives, particularly sodium-based preservatives (i.e., sodium lactate or sodium nitrite), in order to clearly distinguish the effect of sodium chloride reduction.

The absence of preservatives, with the exception of NaCl, guaranteed that following 21 days of storage at 8°C, we would have available spoilage of widely varied intensity, with some samples displaying just the onset of spoilage and others instead with strong qualitative deterioration. Our results confirmed these expectations, as the 25% sodium chloride reduction resulted in stronger spoilage, particularly when MAP packaging was used. These data corroborated those of a recent study showing higher volatile compound production under MAP than under vacuum in beef and pepper foods (45), therefore indicating that VPA would slightly but significantly help in mitigating spoilage that is due to sodium chloride reduction. In terms of the physicochemical properties of raw sausages, salt reduction had only one main effect: significantly higher exudate production due to a decrease in water-binding capacity. The other observed changes, such as the decrease in final pH and color change (graying), were largely general to all spoiled products and were similar to the results of previous studies (46, 47). Some differences were noticed for a few samples, but we could associate these with a specific change in the bacterial communities identified in these products. For example, the samples from batch 05 that demonstrated less graying were enriched in *L. oligofermentans*, while *W. viridescens* and *L. algidus* were abundant in the MAP-packaged samples that displayed increased CO_2 production.

Sodium chloride reduction also induced the appearance of sulfurous off-odors, which, in combination with the sour smells associated with MAP packaging, resulted in strong olfactory deterioration in the 1.5% salt-MAP samples (among the highest spoilage intensity values). Our results also confirmed previous studies (22, 45) that indicated that the off-odors produced in VPA and MAP packaging are different. In our case, VPA produced rancid odors, while MAP produced sour odors.

Recent reviews on meat spoilage have highlighted the fact that spoilage phenomena are hard to decipher (22, 24, 45). Spoilage is often the complex outcome of various metabolic activities that are associated with multiple parameters, such as the type of food (and thus the nutrients available), type of packaging, storage temperature, and last but not least, the diversity of the microbial communities involved in spoilage (48). In an attempt to address this last point, we characterized changes in bacterial diversity in the raw sausages due to sodium chloride reduction. Specifically, we used

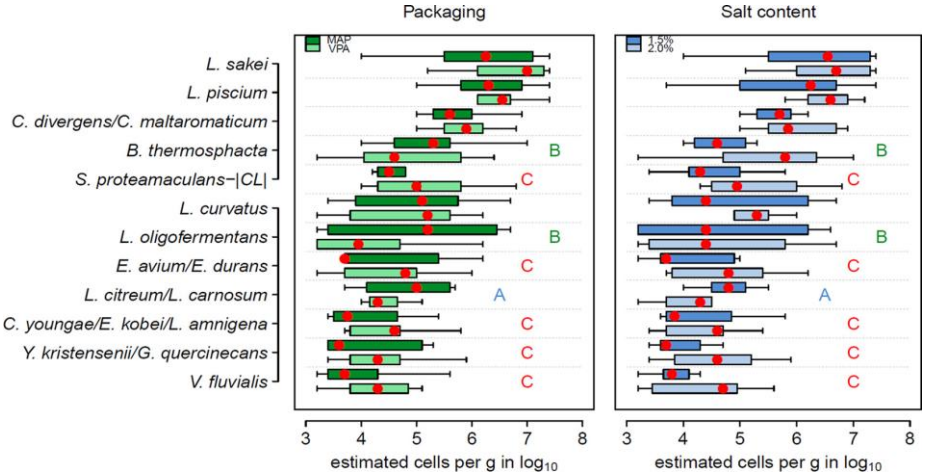


FIG 5 Comparative box plot analysis showing the effect of salt content (right) or packaging type (left) on the abundance of species or species groups. Abundance is expressed in estimated cells per gram ($\log_{10}$) (see Data Set S1 in the supplemental material). The median abundance values (red points) and interquartile range (box) obtained from the 10 samples analyzed per condition are depicted. Species or groups of species are presented in decreasing order of abundance and are separated into two groups: the dominant core and the subdominant core. The three types of classes affected by the experimental conditions are indicated by the following: A, *L. carnosum*/*L. citreum*, with increased population both upon sodium chloride reduction and when MAP packaging was used; B, *B. thermosphacta* and *L. oligofermentans*, with a decrease in population with sodium reduction and increase with MAP packaging; and C, which included OTUs belonging to *Enterococcaceae* and *Enterobacteriaceae*, in particular the species *Serratia proteamaculans*, showing an increase in population at the high sodium chloride concentration and under VPA. The results of several OTUs were combined, such as those for *C. divergens* and *C. maltaromaticum*, showing similar situations in terms of prevalence and abundance pattern (rank 3 and rank 4, respectively). Therefore, their abundance data were combined to lighten the plot without removing important information. Similar strategies were used to combine groups of subdominant populations. |CL| indicates a possible multiaffiliation, as the *Serratia proteamaculans* genotypic clade included *S. grimesii*, *S. plymuthica*, and *S. quinovorans*.

non-culture-based methods (quantitative PCR and 16S amplicon sequencing) in order to evaluate both the diversity and relative abundance of each subpopulation. It is from these analyses that we obtained the most interesting and unexpected results.

Our study showed that all spoiled sausages, regardless of the experimental conditions tested and the type and intensity of spoilage, contained a core bacterial community of about 20 different species. Not surprisingly, these all belong to a group of bacteria that is highly prevalent in spoiled meat and seafood products (20). Also, the high abundance of *L. sakei* in many samples was expected, as this halotolerant bacterium (49, 50) is often counterselected in salted meat products, such as fermented dry sausages (49). This species has been also found to be dominant in MAP-stored poultry sausages and diced bacon (both salted products) at the end of their shelf lives (20). It should be noted that *L. sakei* has occasionally been associated with meat preservation (42, 51, 52) or with the spoilage of some raw meat and seafood products, leading to acidification and the production of off-odors (23, 52–55).

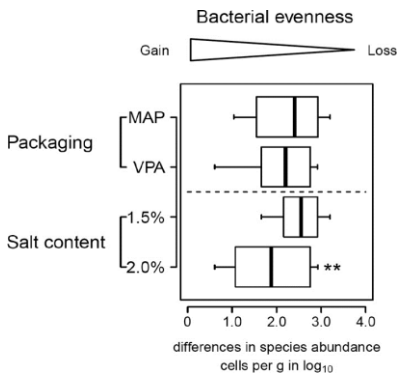


FIG 6 Comparative box plot analysis showing the difference in relative abundance (bacterial evenness) between the most dominant and the subdominant species. The evenness values, expressed in $\Delta\log_{10}$ estimated cells g^{-1} of meat, were obtained from the mean differences in relative abundance between the dominant OTU and each of the subdominant OTUs (see text and Materials and Methods). The closer the difference is to 0, the more even the populations of OTUs are in the samples. Asterisks indicate that samples deviated significantly from the average ($P < 0.05$, two-tailed *t* test).

In our study, *L. sakei* was present at a scale of 5 to almost 8 $\log_{10}$ CFU g^{-1} of meat and was associated with several other species, including *C. divergens*, *L. piscium*, *B. thermosphacta*, *S. proteamaculans*, and other *Enterobacteriaceae*. This core bacterial community is similar to that found recently by Benson et al. (25), who studied the dynamics of microbial growth in raw pork sausage treated with various degrees (3% to 9%) of sodium- and acid-based preservatives. However, their experiments differed from ours in that they used preservatives in addition to spices and salt, and because they did not evaluate the variability of meat batches in their analysis. Nevertheless, they identified *Lactobacillus graminis* (phylogenetically related to *L. curvatus* and belonging to the *L. sakei* genomic clade) as the dominant species and showed that, in their situation, the bacterium originated from the spice mix used.

The purpose of our work was not to seek out the origin of the

spoilage-causing bacteria but to understand how bacterial diversity (richness and evenness) correlated with spoilage. Our most surprising result came from analyses of the evenness parameter of diversity, which was higher in less-spoiled sausages and dropped in spoiled sausages. Furthermore, the loss of evenness in spoiled products was not correlated with a significant increased abundance of the dominant species but, rather, decreased abundance of the subdominant species. In other words, the subdominant bacterial populations, in particular, species of *Enterobacteriaceae*, were much more abundant at the higher sodium chloride concentration. Several previous studies have revealed that a total count of >7 $\log_{10}$ CFU g^{-1} of meat is the threshold for spoilage deterioration (3, 56, 57). Here, all samples contained a bacterial population that was larger than this threshold, but aspect and odor spoilage occurred at either high or low intensity, and samples with low spoilage intensity showed higher species evenness. To a lesser extent, VPA led to results similar to those found with high sodium chloride concentration, but VPA also maintained higher species richness (mainly in the subdominant population). These results are quite different from those obtained by Miller et al. (17), who found that bacterial species diversity was higher in low-sodium ready-to-eat meat products than in products with a regular sodium content. However, a comparison of the two studies should be taken with care, as this previous experiment was carried out with a wider difference in salt content (from 0.3% to 1.2%). Furthermore, they applied less-sensitive methods to assess the subdominant population (plating and denaturing gradient gel electrophoresis), in comparison to the species-specific quantitative PCR and 16S metagenetic pyrosequencing used here.

In a way, our results are quite puzzling and counterintuitive, as the role of sodium chloride, according to current prevailing wisdom, is to keep microbial growth at a low level (6). In this context, two parameters should be taken into account: the effect of salt on the growth rate of bacteria, and the global population level reached by the bacterial community after a long storage time. As a hurdle technology, the effect of salt is to lower the growth rate of many species. A possible explanation of our results is that salt reduction enables the outcompeting of many subdominant populations by few species having advantages to grow on meat. The fast growth of the very dominant species would likely curb the growth of species with lower fitness. Perhaps this is truly the case, and we would have observed this if we had included a growth kinetic study of the bacterial population in fresh products to the use-by date at 21 days. But, regardless of the growth behavior of bacteria during the early days of storage, we show clearly that less-spoiled sausages contain higher bacterial diversity by the end of their shelf life, and both VPA and a high salt concentration mediate this phenomenon. In particular, the high sodium chloride content leads to an increase in the bacterial diversity in raw sausages, which maintains bacterial evenness without decreasing the final bacterial population level to $<10^8$ CFU g^{-1} of meat.

From our point of view, the interpretation of our data opens an interesting question: how would the faster growth of few species upon low salt content lead to higher spoilage intensity if compared to the slower growth of a more-complex community reaching for longer storage time higher population level and evenness? One possible explanation is that high cell density is reached sooner, with few species enabling a longer period for spoilage-associated molecules to accumulate. However, this view does not fully explain why a more diverse bacterial community would lead to lower spoilage intensity. A second possible explanation is that increased diversity of the meat microbiota is associated with more diverse metabolic activity, or perhaps, with a better-equilibrated level in the bacterial trophic food chain. Such a situation may indeed correlate with a lower accumulation of spoilage molecules if some of the species identified in the sausages are organized or grouped into a commensalism relationship (metabolic activities being beneficial to each others). To test this hypothesis, a more-detailed investigation should be conducted, first to follow the dynamics of bacterial communities throughout storage and second to analyze both the microbial metabolites produced and the transcriptomic activities of the microbiota.

Finally, our results also provide evidence for the underappreciated role of the subdominant populations in food ecosystems and in spoilage phenomena. Additional studies are needed, not only to confirm our findings, but also to improve current knowledge on salt reduction in order to further evaluate guidelines about sodium chloride reduction in meat products.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Desvaux and P. Colin for their constructive advice and S. Dumoulin for her technical assistance in the manufacture of pork sausages. We are also grateful to the INRA MIGALE bioinformatics platform for providing computational resources and data storage.

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Lysiane Fougy, was funded by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

A part of this study was supported by the French DRAAF (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt) of Alsace country.

REFERENCES

1. **De Filippis F, La Storia A, Villani F, Ercolini D.** 2013. Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. PLoS One 8:e70222. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070222.
2. **Hultman J, Rahkila R, Ali J, Rousu J, Björkroth KJ.** 2015. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged, cooked sausages. Appl Environ Microbiol 81:7088–7097. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02228-15.
3. **Stoops J, Ruyters S, Busschaert P, Spaepen R, Verreth C, Claes J, Lievens B, Van Campenhout L.** 2015. Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. Food Microbiol 48:192–199. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.012.
4. **Leistner L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int J Food Microbiol 55:181–186. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6.
5. **Hutton T.** 2002. Sodium technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. Br Food J 104:126–152. http://dx.doi.org/10.1108/00070700210423635.
6. **Taormina PJ.** 2010. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. Crit Rev Food Sci Nutr 50:209–227. http://dx.doi.org/10.1080/10408391003626207.
7. **Doyle ME, Glass KA.** 2010. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. Compr Rev Food Sci Food Saf 9:44–56. http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x.
8. **Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P.** 2004. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. Public Health Nutr 7:245–250.
9. **Uzan A, Delaveau P.** 2009. Le sel dans l'alimentation: un problème de santé publique. Ann Pharm Fr 67:291–294. http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2009.03.009.

10. Ruusunen M, Puolanne E. 2005. Reducing sodium intake from meat products. Meat Sci 70:531–541. http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016.
11. Samapundo S, Ampofo-Asiama J, Anthierens T, Xhaferi R, Van Bree I, Szczepaniak S, Goemaere O, Steen L, Dhooge M, Paelinck H, Dewettinck K, Devlieghere F. 2010. Influence of NaCl reduction and replacement on the growth of *Lactobacillus sakei* in broth, cooked ham and white sauce. Int J Food Microbiol 143:9–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.014.
12. McClure PJ, Baranyi J, Boogard E, Kelly TM, Roberts TA. 1993. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. Int J Food Microbiol 19:161–178. http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(93)90074-Q.
13. Mejlholm O, Dalgaard P. 2013. Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant *Lactobacillus* spp. in seafood and meat products. Int J Food Microbiol 167:244–260. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.013.
14. Harper NM, Getty KJK. 2012. Effect of salt reduction on growth of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry systems. J Food Sci 77:M669–M674. http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02975.x.
15. Samapundo S, Anthierens T, Ampofo-Asiama J, Xhaferi R, Van Bree I, Szczepaniak S, Goemaere O, Steen L, Dhooge M, Paelinck H, Devlieghere F. 2013. The effect of NaCl reduction and replacement on the growth of *Listeria monocytogenes* in broth, cooked ham and white sauce. J Food Saf 33:59–70. http://dx.doi.org/10.1111/jfs.12023.
16. Aaslyng MD, Vestergaard C, Koch AG. 2014. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. Meat Sci 96:47–55. http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.004.
17. Miller P, Liu X, McMullen LM. 2015. Microbiota of regular sodium and sodium-reduced ready-to-eat meat products obtained from the retail market. Can J Microbiol 61:150–154. http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2014-0630.
18. Kovačević D, Suman K, Lenart L, Frece J, Mastanjević K, Šubarić D. 2011. Salt reduction in homemade Slavonian sausage: effect on compositional, physico-chemical, colour and texture parameters, sensory characteristics and hygienic quality. Meso 13:244–248.
19. Ercolini D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. Appl Environ Microbiol 79:3148–3155. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00256-13.
20. Chaillou S, Chaulot-Talmon A, Caekebeke H, Cardinal M, Christieans S, Denis C, Hélène Desmonts M, Dousset X, Feurer C, Hamon E, Joffraud J-J, La Carbona S, Leroi F, Leroy S, Lorre S, Macé S, Pilet M-F, Prévost H, Rivollier M, Roux D, Talon R, Zagorec M, Champomier-Vergès M-C. 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. ISME J 9:1105–1118. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.202.
21. Broekaert K, Heyndrickx M, Herman L, Devlieghere F, Vlaemynck G. 2011. Seafood quality analysis: molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. Food Microbiol 28:1162–1169. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.009.
22. Casaburi A, Piombino P, Nychas G-J, Villani F, Ercolini D. 2015. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. Food Microbiol 45:83–102. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002.
23. Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani F, Nychas G-JE. 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. Int J Food Microbiol 157:130–141. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.
24. Remenant B, Jaffrès E, Dousset X, Pilet M-F, Zagorec M. 2015. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. Food Microbiol 45:45–53. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009.
25. Benson AK, David JRD, Gilbreth SE, Smith G, Nietfeldt J, Legge R, Kim J, Sinha R, Duncan CE, Ma J, Singh I. 2014. Microbial successions are associated with changes in chemical profiles of a model refrigerated fresh pork sausage during an 80-day shelf life study. Appl Environ Microbiol 80:5178–5194. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00774-14.
26. European Parliament. 2006. Regulation (EC) no. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. European Parliament, Luxembourg, France.
27. International Organization for Standardization. 1999. ISO 2917:1999. Meat and meat products—measurement of pH—reference method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
28. Barott KL, Rodriguez-Brito B, Janouškovec J, Marhaver KL, Smith JE, Keeling P, Rohwer FL. 2011. Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*. Environ Microbiol 13:1192–1204. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02419.x.
29. Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics 27:863–864. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026.
30. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res 42:D633–D642. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1244.
31. Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR. 2012. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. Appl Environ Microbiol 78:717–725. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06516-11.
32. Lee CK, Herbold CW, Polson SW, Wommack KE, Williamson SJ, McDonald IR, Cary SC. 2012. Groundtruthing next-gen sequencing for microbial ecology—biases and error in community structure estimates from PCR amplicon pyrosequencing. PLoS One 7:e44224. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044224.
33. Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environ Microbiol 12:118–123. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x.
34. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. Nat Methods 10:57–59. http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2276.
35. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and Web-based tools. Nucleic Acids Res 41:D590–D596. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1219.
36. Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. Bioinformatics 28:1823–1829. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252.
37. Kim O-S, Cho Y-J, Lee K, Yoon S-H, Kim M, Na H, Park S-C, Jeon YS, Lee J-H, Yi H, Won S, Chun J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol 62:716–721. http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0.
38. Chao A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scand J Stat 11:265–270.
39. R Core Development Team. 2015. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
40. Verzani J. 2015. UsingR: data sets, etc. for the text "Using R for introductory statistics," 2nd ed. R package version 2.0.5. https://cran.r-project.org/web/packages/UsingR/index.html.
41. Wickham H, Chang W, Wickham MH. 2013. ggplot2: elegant graphics for data analysis, version 1.0.1. Springer-Verlag, New York, NY.
42. Chaillou S, Christieans S, Rivollier M, Lucquin I, Champomier-Vergès MC, Zagorec M. 2014. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. Meat Sci 97:332–338. http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.009.
43. Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 64:346–351. http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0.
44. Beisel J-N, Usseglio-Polatera P, Bachmann V, Moreteau J-C. 2003. A comparative analysis of evenness index sensitivity. Int Rev Hydrobiol 88:3–15. http://dx.doi.org/10.1002/iroh.200390004.
45. Pothakos V, Snauwaert C, De Vos P, Huys G, Devlieghere F. 2014. Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. Food Microbiol 39:61–67. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.005.
46. Sofos JN. 1983. Effects of reduced salt (NaCl) levels on the stability of frankfurters. J Food Sci 48:1684–1691. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb05061.x.
47. Lee HC, Chin KB. 2011. Evaluation of various salt levels and different dairy proteins in combination with microbial transglutaminase on the quality characteristics of restructured pork ham. Int J Food Sci Technol 46:1522–1528. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02654.x.

48. Nychas G-JE, Skandamis PN, Tassou CC, Koutsoumanis KP. 2008. Meat spoilage during distribution. Meat Sci 78:77–89. http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020.
49. Champomier-Vergès M-C, Chaillou S, Cornet M, Zagorec M. 2001. *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. Res Microbiol 152:839–848. http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01267-0.
50. Chaillou S, Champomier-Vergès M-C, Cornet M, Crutz-Le Coq A-M, Dudez A-M, Martin V, Beaufils S, Darbon-Rongère E, Bossy R, Loux V, Zagorec M. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Nat Biotechnol 23:1527–1533. http://dx.doi.org/10.1038/nbt1160.
51. Jones RJ, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. 2009. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. Food Microbiol 26:876–881. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.003.
52. Pothakos V, Devlieghere F, Villani F, Björkroth J, Ercolini D. 2015. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. Meat Sci 109:66–74. http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014.
53. Tsigarida E, Skandamis P, Nychas G-JE. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. J Appl Microbiol 89:901–909.
54. Ercolini D, Russo F, Torrieri E, Masi P, Villani F. 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. Appl Environ Microbiol 72:4663–4671. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00468-06.
55. Ercolini D, Russo F, Nasi A, Ferranti P, Villani F. 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. Appl Environ Microbiol 75:1990–2001. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02762-08.
56. Koutsoumanis KP, Stamatiou AP, Drosinos EH, Nychas G-JE. 2008. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. Food Microbiol 25:915–921. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.006.
57. Degirmencioglu N, Kizilirmak Esmer O, Irkin R, Degirmencioglu A. 2012. Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on shelf life extention of minced meat chemical and microbiological changes. J Anim Vet Adv 11:898–911. http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2012.898.911.
58. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J Clin Microbiol 37:3497–3503.

Supplementary file S1

Supporting file S1 for: Reducing Salt in Raw Pork Sausages Increases Spoilage and Correlates with Reduced Bacterial Diversity. (Fougy *et al.*)

Objectives: 1 Analysis of sequencing coverage by rarefaction curves.
2 Conversion of relative abundance (number of pyrosequencing reads) into an extrapolated estimation of population level in cells.g^{-1}.

1. Analysis of sequencing coverage by rarefaction curves.

The objective of this analysis was to determine the sequencing coverage of our samples using rarefaction curves. This analysis was carried from the OTU abundance table (file S2) and rarefaction was performed using PHYLOSEQ package (1) from R statistical software using the function ggrare with a step of 100 reads. We focused our comparative analysis on separating samples by their experimental conditions (salt content and type of packaging) in order to verify if the lower bacterial richness found in MAP packaging and low salt content was not due to a too low sequencing depth. Results are shown in figure S1a below.

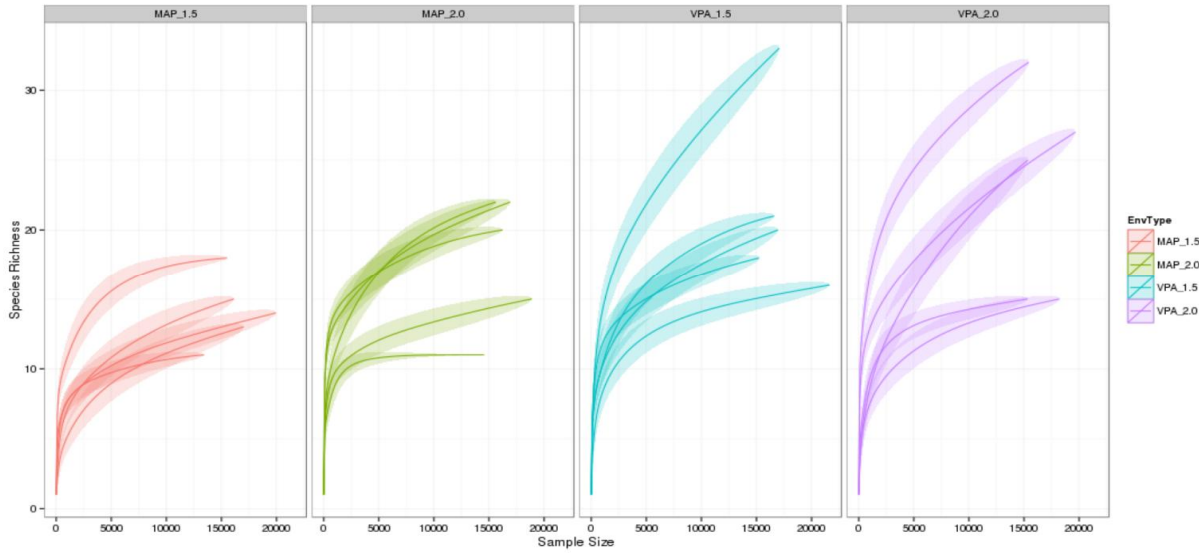


Figure S1a: Rarefaction curves showing the coverage of bacterial OTU richness (species richness in number of OTUs) as a function of sequencing depth (sample size in number of reads). Samples codes are as described in the main body of the article: MAP, Modified Atmosphere Packaging; VPA, Vacuum Packaging, 1.5, 1.5% (wt/wt) salt content and 2.0, 2.0% (wt/wt) salt content. The curves from five samples in each condition are plotted together.

Rarefaction analysis showed that our sequencing depth (around 15,000 reads in average) was largely enough to capture the bacterial richness in our samples, in particular in samples stored under MAP conditions. In four samples stored under VPA conditions and in particular those with a 2.0% salt content, sequencing coverage might not have been sufficient to capture the whole diversity of sub-dominant OTUs.

2. Conversion of relative abundance (number of pyrosequencing reads) into an extrapolated estimation of population level in cells.g^{-1}.

The objective of this work was two folds: (1) to quantify, using quantitative PCR (qPCR), the population level (in cfu.g^{-1}) of the dominant OTUs in our samples and thereby to verify the abundance ratios between these species; (2) to use a linear regression between relative abundance (number of reads obtained by pyrosequencing) and absolute quantification by qPCR in cfu.g^{-1} in order to convert the read's number into an estimated population level (in cell.g^{-1}). For this purpose we carried out calibration curves with a set of species and probes.

2.1 **Calibration curves to quantify bacteria in meat using quantitative PCR.**

The calibration is based on a standardized protocol for extracting bacterial cells from 10 grams of meat and then for extracting DNA from the amount of cells recovered (see material & methods and reference 2 in this file). This protocol is the same used in the extraction of DNA performed for our raw pork sausages samples described in this work. A set of 18 species and of 23 specific probes were designed or chosen from literature (table 4 in the body of the article) to elaborate a strategy encompassing a large array of species- or genus-specific probes, most of them corresponding to the abundant OTUs found in our analysis of raw pork sausage diversity. Calibration curves were obtained, for each species, by inoculating one given strain in 10 grams of meat and by extracting DNA from that sample. The bacterial inoculation level ranged from 10^2 to 10^8 cfu.g^{-1} of meat and was quantified by plating of decimal dilutions in appropriate culture media. DNA was then extracted. Each calibration curve was elaborated by three biological replicates. As described in Table 4 (article), probes were either designed in genes present in single copy in bacterial chromosome (*e.g. rpoB*) or in a gene present at several copies on the chromosome (16S rDNA ribosomal SSU). All calibration curves (n=65 in total) were then plotted together to estimate the experimental error rate obtained during quantification. As shown in Figure S1b, a linear regression could be calculated for both types of gene probe (single gene probe or 16S gene probe). The relevant equations can be found in Table S1c. At similar Ct values, the two equations provide a quantification of 7.1-fold difference (16S gene probe equation gives a lower quantification at equal Ct value if compared to single gene probe equation), which is in a good agreement with the average copy number of 16S SSU rRNA in the chromosome of the species including in the study (usually between 5 and 7 copies).

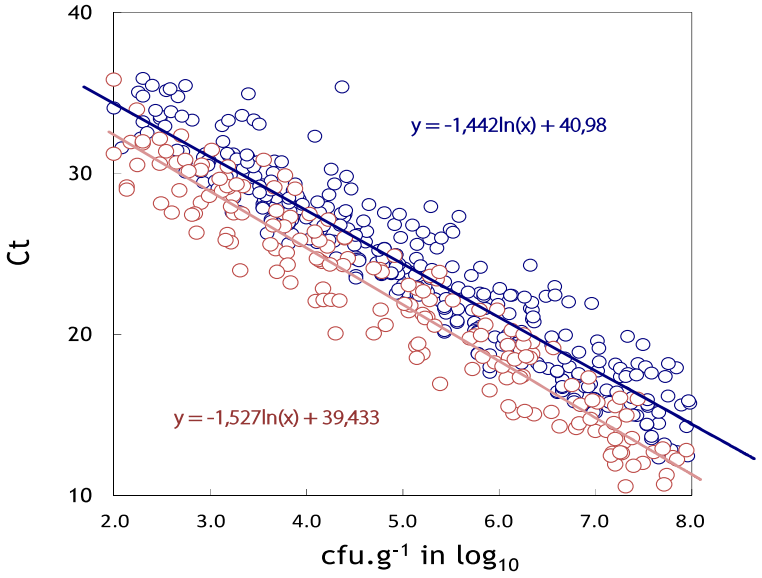


Figure S1b: calibration curves to determine bacterial concentration in meat by quantitative PCR. Calibration curves obtained with 16S gene probes are shown in red circles (red linear regression line is obtained from all curves) and calibration curves obtained with single gene probes are shown in blue circles (blue linear regression line is obtained from all curves). The detection limit is set around 2.5 $\log_{10}$ cfu.g^{-1} (Ct ~30). From this calibration curves, equation have been obtained according to the type of probe (table 4 in the article).

Table S1c: Mathematical equations used for bacterial quantification in meat from Ct values..

Type of probe	Equations
16S gene probe	$cfu.g^{-1} = e\left(\frac{Ct-39.43}{-1.53}\right)$ (1)*
Single-copy gene probe	$cfu.g^{-1} = e\left(\frac{Ct-40.98}{-1.44}\right)$ (2) *

* For both equations, we estimated the experimental standard error (average deviation of all measurements from the linear regression line; *SE* ~ 0.02 $\log_{10}$ cfu.g^{-1}).

2.2 **Quantification of the most dominant species or bacterial groups in spoiled sausages.**

From the probes listed in Table 4 (article), a set nine were selected for quantification of bacterial groups identified from the 16S rDNA sequencing analysis. Seven probes were selected from the dominant bacterial groups and two others were corresponding to sub-dominant species identified at a high relative abundance in only few samples (*i.e. Lactobacillus algidus* and *Weissella viridescens*). Results are shown in Table S1d below.

Table S1d: Quantification of bacteria in spoiled raw pork sausages.

Batch name	Bacterial species or bacterial groups and probes								
(packaging – batch – salt content)	*L.sakei* *katA*	*L. piscium* *rpoA*	*Carnobacterium spp.* *16S probe*	*B. thermosphacta* *rpoC*	*Serratia spp.* *16S probe*	*L.curvatus* *katA*	*Enterococcus spp.* *tuf*	*L. algidus* *rpoA*	*Weissella spp.* *16S probe*
MAP_B04_15	7.53	5.88	5.23	2.64	6.33	< *dl*	3.53	< *dl*	< *dl*
MAP_B05_15	7.6	7.28	5.81	4.69	5.9	7.31	4.5	5.29	2.96
MAP_B06_15	6.57	8.14	5.73	3.69	5.74	3.21	4.77	6.1	3.01
MAP_B08_15	< *dl*	3.76	5.63	3.53	5.7	4.37	4.82	2.75	7.51
MAP_B10_15	6.1	6.91	6.23	5.63	5.44	4.04	3.38	7.7	3.21
MAP_B04_20	6.81	5.92	5.4	4.29	7.31	< *dl*	3.49	< *dl*	2.88
MAP_B05_20	7.61	7.07	6.02	4.36	5.75	6.58	5.21	< *dl*	3.19
MAP_B06_20	6.88	7.62	5.16	2.87	6.76	5.77	5.99	< *dl*	2.89
MAP_B08_20	3.76	5.33	6.14	5.97	6.6	4.45	5.84	< *dl*	2.65
MAP_B10_20	5.59	6.93	6.52	5.43	5.79	5.18	4.56	7.13	3.09
VPA_B04_15	6.75	4.58	5.51	< *dl*	6.64	< *dl*	5.59	< *dl*	2.61
VPA_B05_15	7.62	7.45	6.1	4.2	6.4	6.8	4.3	5.91	2.91
VPA_B06_15	6.8	8.18	5.67	3.94	6.48	4.66	4.39	4.3	2.72
VPA_B08_15	6.23	5.5	5.09	3.77	6.92	< *dl*	4.45	2.57	3.59
VPA_B10_15	5.22	6.86	6.49	4.83	5.32	< *dl*	< *dl*	7.59	2.89
VPA_B04_20	7.06	< *dl*	5.17	< *dl*	6.4	< *dl*	3.83	< *dl*	2.86
VPA_B05_20	7.85	7.19	5.94	3.07	6.23	6.08	4.94	5.49	3.83
VPA_B06_20	6.94	7.48	5.43	3.21	6.35	< *dl*	5.01	< *dl*	3.11
VPA_B08_20	3.92	5.82	5.74	5.21	7.14	4.56	5.62	< *dl*	3.26
VPA_B10_20	5.15	6.53	6.27	5.37	6.03	6.21	4.79	6.21	2.71

Blue cells (< dl) indicate a quantification below the detection limit of 2.5 cfu.g^{-1}.
Light orange and green blocks indicate the experimental conditions where the given species or bacterial group showed the highest and lowest concentration, respectively. Dark orange cells indicate the species or bacterial group being the most abundant in each sample.
All measurements were performed in duplicates and showed less than 1% variation.

The relative abundance (number of reads) obtained from pyrosequencing was then plotted as a function of the bacterial concentration determined by qPCR (figure S1e). The relationship between these two measurements was rather good but deteriorated below 100 reads. Furthermore, there was a slight discrepancy between relative abundance (number of pyrosequencing reads) and concentration for *Serratia spp*. The specificity of *Serratia spp.* probe was checked on several closely-related genera from *Enterobacteriaceae* family (*Citrobacter, Hafnia, Enterobacter, Rahnella*) and revealed that our probe was highly specific of species from genus *Serratia*. Thus, our data suggest that *Serratia spp*. is under-detected in pyrosequencing analysis. The resulting linear regression was used to convert relative read counts into an extrapolated estimation of the bacterial concentration in cells.g^{-1} of meat for all OTUs.

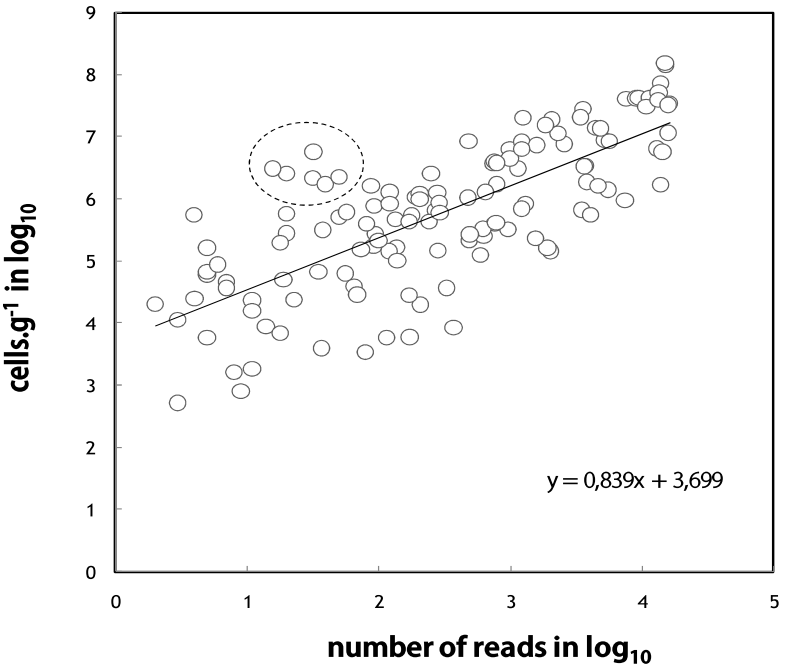


Figure S1e: Relative abundance obtained from pyrosequencing as a function of bacterial concentration determined by qPCR. The discrepancy for *Serratia spp.* quantification is highlighted with a dashed circle.

REFERENCES

1. **McMurdie PJ, Holmes S.** 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, **8**(4), pp. e61217. http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217.

2. **Chaillou S**, **Christieans S**, **Rivollier M**, **Lucquin I**, **Champomier-Vergès MC**, **Zagorec M**. 2014. Quantification and efficiency of Lactobacillus sakei strain mixtures used as protective cultures in ground beef. Meat Sci **97**:332–338.

5.2.5. Conclusion et perspectives

Ces travaux montrent les effets d'une modification de la composition des chipolatas (baisse de la teneur en sel) et des conditions de stockage (atmosphère de conservation) sur la diversité bactérienne des produits. Par la méthode globale utilisée, nous avons pu discriminer la population bactérienne dominante de la population sous-dominante et pour la première fois, nous avons identifié que la réduction de la teneur en sel impactait l'abondance des espèces sous-dominantes. La réduction de la teneur en sel entraîne, non pas une augmentation de l'abondance des espèces dominantes, mais plutôt une diminution de l'abondance des espèces sous-dominantes. Ces résultats sont novateurs par rapport à ce qui a pu être réalisé dans des études précédentes où les impacts de la réduction de sel ont été étudiés en ciblant une ou plusieurs espèces cibles dominantes.

Les travaux montrent également le lien entre la baisse de diversité observée dans les chipolatas à teneur réduite en sel et conditionnées sous atmosphère modifiée en fin de conservation et le développement plus important de l'altération dans ces conditions. Les différences d'altération observées en lien avec les modifications d'abondance des populations suggèrent des activités métaboliques différentes des communautés bactériennes tout au long de la conservation des produits.

5.3. La réduction de la teneur en sel impacte les activités métaboliques des espèces sous-dominantes de la communauté bactérienne des chipolatas

5.3.1. Hypothèses et objectifs

L'étude précédente a mis en évidence que le sel modifiait l'abondance des espèces bactériennes sous-dominantes des chipolatas après 21 jours de conservation et que cette baisse de diversité était corrélée à une intensité d'altération des chipolatas plus importante. De ces faits, cette modification d'abondance suggère une modification des activités métaboliques bactériennes qui pourraient être en lien avec les défauts d'altération observés. De plus, la nature de l'altération des chipolatas est différente selon l'atmosphère de conditionnement et l'utilisation d'atmosphère modifiée diminue la richesse bactérienne des échantillons. Les différences d'altération observées suggèrent également des différences d'activités métaboliques bactériennes.

Les objectifs de cette étude étaient (1) d'identifier les espèces bactériennes métaboliquement actives après 21 jours de conservation, (2) d'identifier les gènes exprimés et les fonctions métaboliques affectées par la réduction de la teneur en sel et (3) de déterminer les liens entre les fonctions métaboliques bactériennes et les défauts d'altération observés à 21 jours de conservation.

5.3.2. Démarche expérimentale

Pour répondre à ces objectifs, nous avons fait le choix d'analyser les activités transcriptionnelles, par RNAseq, de la communauté bactérienne des chipolatas altérés. Cette méthode d'investigation consiste en une évaluation qualitative et quantitative des gènes exprimés par la communauté bactérienne à un temps donné et permet d'avoir accès aux

activités transcriptionnelles bactériennes après 21 jours de conservation. Ces analyses ont été réalisées à partir du même plan d'expérience que celui utilisé pour la caractérisation de la communauté bactérienne des chipolatas altérées (cf. paragraphe 5.1).

5.3.3. Stratégie d'analyse des données RNAseq et résultats de séquençage

L'utilisation du RNAseq dans les produits alimentaires est une approche à ce jour peu connue, c'est pourquoi nous souhaitons dans un premier temps présenter la stratégie d'analyse de RNAseq que nous avons élaborée. Cette démarche d'analyse a été réalisée en plusieurs étapes présentées dans la Figure 21. Chacune des étapes est décrite à la suite de la figure.

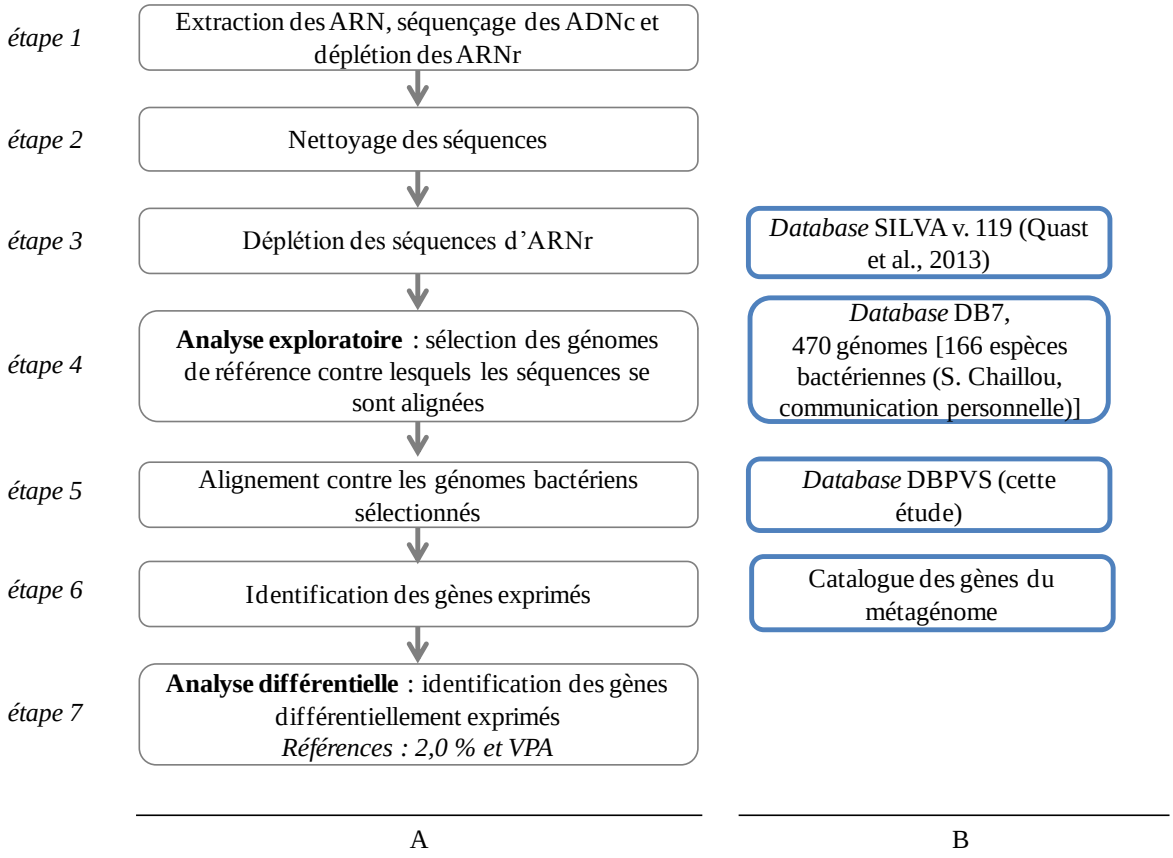


Figure 21 : stratégie d'analyse des données de RNAseq

Les éléments indiqués dans la colonne A sont les étapes de l'analyse RNAseq et les éléments présentés dans la colonne B sont les bases de données utilisées ou construites à chacune des étapes.

5.3.3.1. Étape 1 : extraction des ARN et séquençage des ADNc

Les ARN bactériens totaux ont été extraits *in situ* à partir des chipolatas altérées. La méthode d'extraction utilisée (méthode au Trizol) a permis d'extraire des quantités d'ARN suffisantes pour le séquençage, de 290 ng.µL^{-1} à 4 730 ng.µL^{-1}, en conservant une bonne intégrité ; les RIN (RNA Integrity Number) étaient compris dans une plage allant de 6,3 à 10.

Pour les 16 échantillons, la profondeur de séquençage (nombre total de séquences) est comprise entre 12 et 29 millions de séquences (Tableau 8). La profondeur de séquençage que nous souhaitions par échantillon était au moins de 15 millions de séquences, car cette profondeur de séquençage permettait de disposer de suffisamment de séquences par gène sur une échelle de 3log$_{10}$ entre les gènes les plus abondants et les moins abondants. Par exemple, si l'on considère un génome de 2 500 gènes, à 15 millions de lectures, chaque gène peut être représenté par 4 000 lectures (400 pour une espèce dont l'abondance est inférieure d'un facteur 10, 40 à un facteur 100 et 4 à un facteur 1 000, seuil en dessous duquel l'analyse ne peut plus être réalisée).

5.3.3.2. Étapes 2 et 3 : nettoyage des séquences et déplétion des séquences d'ARNr

Après le séquençage, les séquences de mauvaise qualité ont été supprimées et celles correspondant à des séquences d'ARN ribosomaux ont été déplétées (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.1 pour plus de précisions). De ce nettoyage, 74 % des séquences brutes ont été conservées (Tableau 8) et la suite de l'analyse sera réalisée sur ces séquences nettoyées.

5.3.3.3. Étape 4 : Analyse exploratoire

Notre stratégie d'alignement pour identifier les gènes exprimés se divisait en deux étapes. La première, dite exploratoire, avait pour objectif de sélectionner parmi

Tableau 8 : données de séquençage et d'alignement des séquences des 16 échantillons contre les génomes bactériens de référence

Nom de l'échantillon (conditionnement_lot_sel)[a]	Nombre de séquences brutes	Nombre de séquences obtenues après nettoyage et déplétion des ARN ribosomaux	Nombre de séquences s'alignant contre la base de référence DB7[b]	Nombre de séquences s'alignant contre la base de référence DBPVS[c]	Nombre de séquences s'alignant contre le génome de *Sus scrofa*[d]
MAP_B04_15	12 125 052	8 574 885 (71 %)	2 117 296 (25 %)	2 094 004 (24 %)	6 009 058 (70 %)
MAP_B05_15	12 929 442	9 836 650 (76 %)	4 604 311 (47 %)	4 547 190 (46 %)	4 630 392 (47 %)
MAP_B06_15	19 600 564	13 511 255 (69 %)	2 699 405 (20 %)	2 659 354 (20 %)	10 306 717 (76 %)
MAP_B07_15	13 729 639	11 112 268 (81 %)	6 156 847 (55 %)	6 064 663 (55 %)	4 517 964 (41 %)
MAP_B04_20	13 712 211	9 884 563 (72 %)	2 456 858 (25 %)	2 426 577 (25 %)	6 756 026 (68 %)
MAP_B05_20	20 227 367	15 547 174 (77 %)	8 638 200 (56 %)	8 524 818 (55 %)	5 897 399 (38 %)
MAP_B06_20	15 390 632	11 765 880 (76 %)	1 920 250 (16 %)	1 891 013 (16 %)	9 323 994 (79 %)
MAP_B07_20	15 354 574	11 000 286 (72 %)	3 733 488 (34 %)	3 671 980 (33 %)	6 587 385 (60 %)
VPA_B04_15	13 144 512	9 581 059 (73 %)	2 940 425 (31 %)	2 891 785 (30 %)	5 929 107 (62 %)
VPA_B05_15	16 217 250	12 772 579 (79 %)	8 057 133 (63 %)	7 978 208 (62 %)	4 155 679 (33 %)
VPA_B06_15	14 670 597	10 072 396 (69 %)	2 290 139 (23 %)	2 268 112 (23 %)	7 318 868 (73 %)
VPA_B07_15	15 315 100	11 802 127 (77 %)	5 627 481 (48 %)	5 529 819 (47 %)	5 534 082 (47 %)
VPA_B04_20	13 610 389	9 424 881 (69 %)	2 188 217 (23 %)	2 154 957 (23 %)	6 438 446 (68 %)
VPA_B05_20	29 164 930	22 534 612 (77 %)	12 582 079 (56 %)	12 470 927 (55 %)	8 778 011 (39 %)
VPA_B06_20	18 868 452	13 589 499 (72 %)	4 804 407 (35 %)	4 751 287 (35 %)	8 119 785 (60 %)
VPA_B07_20	14 668 968	10 525 676 (72 %)	2 436 493 (23 %)	2 399 479 (23 %)	7 542 873 (72 %)
total	258 729 679	191 535 790 (74 %)	73 253 029 (38 %)	72 324 173 (38 %)	107 845 786 (56 %)

[a] MAP = sous atmosphère modifiée ; VPA = sous vide ; 15 = 1,5 % de NaCl ; 20 = 2,0 % de NaCl
[b] Nombre de séquences s'alignant contre les génomes bactériens de référence de la base DB7 exprimé en nombre de séquences et en pourcentage par rapport au nombre de séquences obtenues après nettoyage
[c] Nombre de séquences s'alignant contre les génomes bactériens de référence de la base DBPVS exprimé en nombre de séquences et en pourcentage par rapport au nombre de séquences obtenues après nettoyage
[d] Nombre de séquences s'alignant contre le génome de *Sus scrofa* exprimé en nombre de séquences et en pourcentage par rapport au nombre de séquences obtenues après nettoyage

une database (DB7) contenant un nombre de génomes bactériens relativement vaste, 470 génomes de souches bactériennes correspondant à 166 espèces bactériennes différentes, les génomes pour lesquels un nombre de lectures s'était aligné témoignant d'une activité transcriptionnelle. La liste des génomes de référence composant cette DB7 est disponible dans l'annexe 8.3. Pour construire cette base (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.2 pour plus de précisions), le choix de ces génomes a été fait à partir des espèces identifiées dans différents produits carnés et produits de la mer altérés (Chaillou *et al*., 2015) auxquelles ont été rajoutés quelques génomes d'espèces bactériennes présentes dans les chipolatas altérées (Fougy *et al*., 2016) et non identifiées lors de la première étude (e.g. *Lelliottia amnigena*). L'objectif visé à l'utilisation d'un grand nombre de génomes de référence était de pouvoir détecter des espèces sous-dominantes métaboliquement actives non détectées par pyroséquençage (Figure 22). De plus, ce large choix de génomes de référence permet de sélectionner la bonne référence génomique pour mieux représenter l'alignement. En effet, pour certaines espèces, cas par exemple de *L. sakei*, il existe plusieurs génomes de référence pour la même espèce. L'intégration de plusieurs références permet de mettre en avant la diversité des espèces.

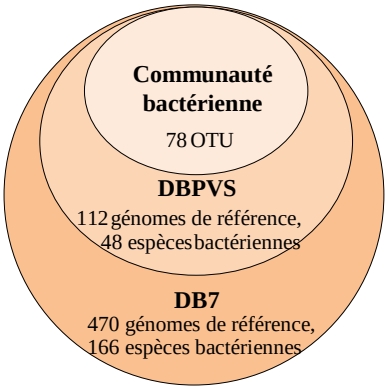


Figure 22 : nombre de génomes bactériens de référence contenu dans les différentes bases de données pour l'alignement des séquences d'ARN et comparaison avec le nombre d'OTU identifiés par pyroséquençage (Fougy *et al*., 2016)

5.3.3.4. Étape 5 : alignement contre les génomes bactériens sélectionnés

Au seuil de 1 000 reads par lectures par génome (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.2 pour plus de précisions), un sous-ensemble de génomes de référence de la DB7 a été sélectionné pour créer un deuxième catalogue de génomes de référence, DBPVS. Par ailleurs, lorsque plusieurs génomes de référence de la même espèce présentaient des écarts importants en nombre de séquences alignées, les références dont l'alignement était trop faible n'ont pas été sélectionnées. Nous avons considéré que ce faible alignement de séquences correspondait à de l'alignement aléatoire de régions conservées entre souches sur une référence génomique ou une autre et que ces mêmes séquences s'aligneraient parfaitement sur une autre référence génomique de cette espèce.

5.3.3.5. Étape 6 : identification des gènes exprimés

Pour identifier les gènes exprimés par les espèces métaboliquement actives (définies comme étant le métagénome), les informations d'abondance des gènes ont été extraites à l'aide d'un catalogue de gènes répertoriant l'ensemble des gènes de toutes les espèces bactériennes du métagénome (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.3 pour plus de précisions). À ces données d'abondance, ont été associées les différentes informations caractérisant chaque gène (e.g. coordonnées de position sur le génome, produits pour lequel les gènes codent, classification fonctionnelle).

5.3.3.6. Étape 7 : analyse différentielle

La dernière étape à l'analyse des données RNAseq consistait à identifier, par analyse statistique, les gènes différentiellement exprimés selon les quatre conditions d'étude (deux teneurs en sel et deux types d'atmosphère de conditionnement). L'analyse différentielle a été réalisée à partir du catalogue de l'ensemble les gènes du métagénome (soit 227 383 gènes, cf.

matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.4 pour plus de précisions). Pour l'analyse différentielle de l'expression des gènes selon la teneur en sel, les échantillons à 2,0 % de sel ont été utilisés comme référence de comparaison et dans le cas de la comparaison de l'expression des gènes selon le type de conditionnement, les échantillons conditionnés sous vide ont été choisis comme référence.

5.3.4. Les transcriptomes de *Lactobacillus sakei* et de *Serratia* spp. représentent les activités transcriptionnelles majoritaires

5.3.4.1. Identification des génomes bactériens de référence

De manière inattendue, après l'alignement des séquences contre le catalogue des génomes bactériens de référence DB7, plus de 60 % des séquences ne se sont pas alignées contre ces génomes (Tableau 8). Pour identifier la nature de ce fort pourcentage de séquences non alignées, un second alignement a été réalisé contre le génome de *Sus scrofa* (nom binomial du porc) et a révelé qu'effectivement 56 % des ARN séquencés correspondaient à des ARN issus du porc (Tableau 8) dont 39 % était de l'ARN mitochondrial 16S et 43 % de l'ARNm génomique. Le pipeline d'analyse utilisé n'a pas permis d'identifier les 6 % d'ARN restant (ne correspondant ni aux génomes bactériens de la DB7 ni au génome de *Sus scrofa*).

À partir de l'alignement des séquences contre la base DB7, 112 génomes bactériens de référence, correspondant à 64 souches bactériennes (ou 48 espèces bactériennes), ont été sélectionnés et ont constitué la nouvelle base de génomes bactériens de référence, DBPVS. La liste des génomes bactériens de la DBPVS est disponible en annexe 8.4. Pour établir la table d'abondance contenant le nombre de séquences alignées sur chacune des 64 souches bactériennes, le nombre de séquences correspondant au chromosome et au(x) plasmide(s) de chaque espèce ont été additionnées.

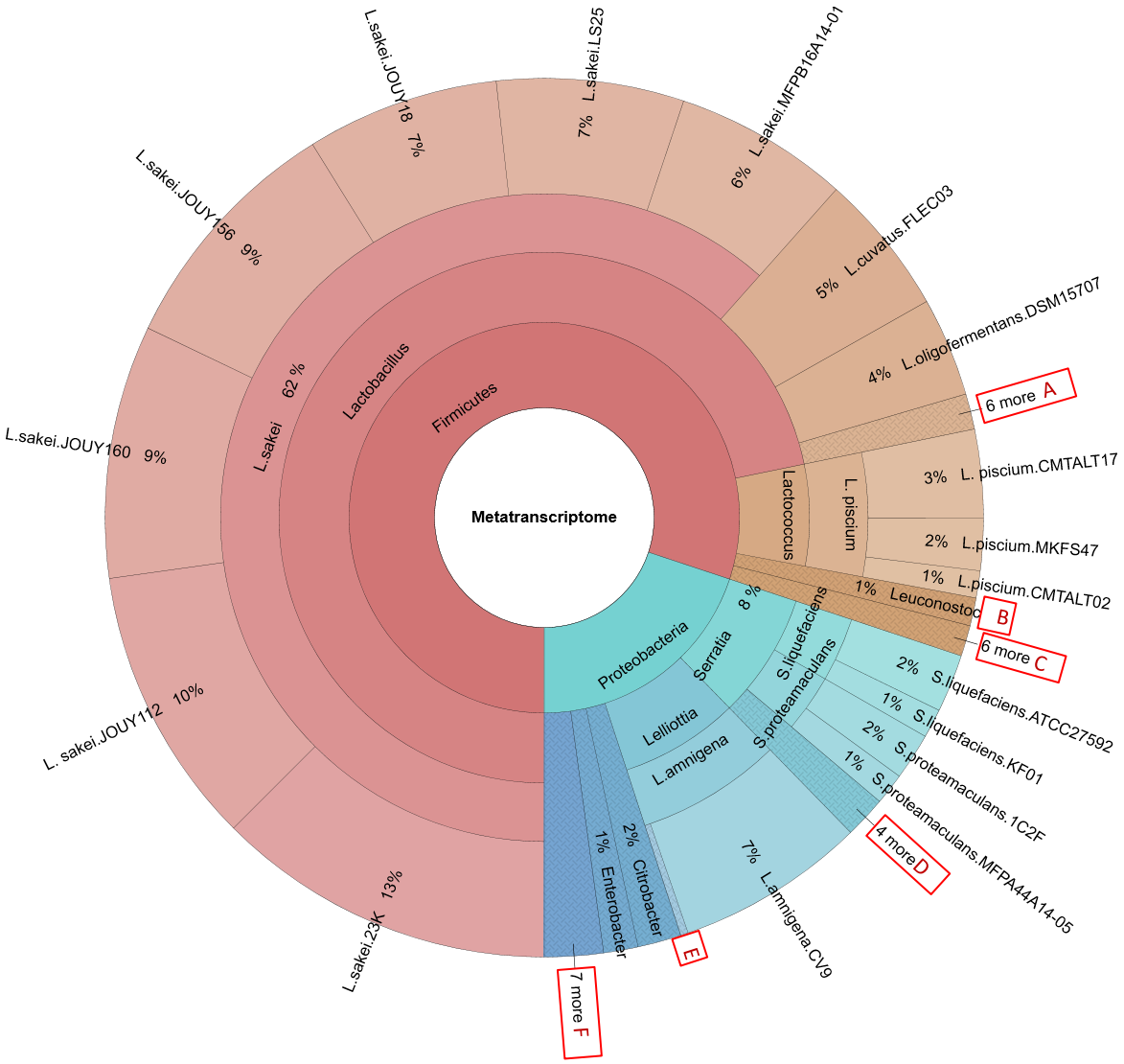


Figure 23 : abondance relative des différents transcriptomes

La Figure 23 représente l'abondance relative des différents transcriptomes associés à chaque souche bactérienne (en pourcentage de l'abondance totale) du métatranscriptome des chipolatas altérées après 21 jours de stockage à 8 °C, toutes conditions (teneur en sel et atmosphère de conditionnement) confondues. Les souches bactériennes faiblement exprimées (représentées par des cadres rouges) sont : À : *Lactobacillus fuchuensis* MFPC41A28-01 (0,6 %), *Lactobacillus hokkaidonensis* LOOC260 (0,2 %), *Lactobacillus graminis* DSM20719 (0,2 %), *Lactobacillus algidus* CMTALT10 (0,1 %), *Lactobacillus algidus* DSM15638 (0,1 %), *Lactobacillus malefermentans* DSM5705 (0,06 %). B : *Leuconostoc gelidum* KCTC3537 (0,5 %), *Leuconostoc carnosum* MFPC16A28-03 (0,3 %), *Leuconostoc citreum* LBAEC11 (0,1 %), *Leuconostoc gelidum* MFPA44A14-01 (0,07 %), *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293 (0,06 %). C : *Carnobacterium* spp. (0.6 %), *Weissella hellenica* WIKIM14 (0,2%), *Enterococcus* spp. (0,2 %), *Brochothrix thermosphacta* (0,08 %), *Aerococcus viridans* ATCC11563 (0,02 %), *Vagococcus fluvialis* bH819 (0,02 %). D : *Serratia plymuthica* (AS9 et S13, 0,6 %), *Serratia grimesii* A2 (0,5 %), *Serratia fonticola* AU-AP2C (0,3 %), *Serratia marcescens* FGI94 (0,2 %). E : *Lelliottia amnigena* (0,3 %). F : *Rahnella aquatilis* HX2 (0,8 %), *Hafnia* spp. (0,5 %), *Raoultella* spp. (0,4 %), *Yersinia* spp. (0,2 %), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (0,2 %), *Pantoea agglomerans* IG1 (0,06 %) et *Morganella psychrotolerans* 925 (0,04 %).

5.3.4.1. Composition de la population bactérienne active dans les chipolatas

L'abondance relative des différents transcriptomes associés aux 64 souches bactériennes est présentée dans la Figure 23. Parmi les *Firmicutes* (80 % de l'abondance totale), les transcriptomes des espèces de *Lactobacillus* sont les plus abondants (72 % de l'abondance totale) et parmi elles, *Lactobacillus sakei* est l'espèce majoritaire (68 % de l'abondance totale). Cette espèce bactérienne présente une forte diversité de souches. Dans la DB7, 14 génomes de différentes souches de *L. sakei* sont présents, mais les séquences ne se sont alignées de manière majoritaire (> 1 000 lectures) que contre 7 des références génomiques et seulement celles-ci ont été sélectionnés dans la DBPVS. La Figure 23 illustre la répartition des séquences entre ces 7 références génomiques.

Parmi les *Proteobacteriaceae* (20 % de l'abondance totale), l'abondance des transcriptomes dominants de *Lelliottia* et de *Serratia* est similaire, 36 et 38 % respectivement de l'abondance des *Proteobacteriaceae*. La diversité de *Lelliottia* n'est représentée que par deux souches de *L. amnigena* (anciennement *Enterobacter amnigenus*, (Brady *et al*., 2013) contre six espèces pour le genre *Serratia*. Ce sont *Serratia liquefaciens* (16 % de l'abondance des *Proteobacteriaceae*) et *Serratia proteamaculans* (14 % de *Proteobacteriaceae*) qui dominent à des niveaux d'expression similaires, mais ce genre est également représenté par deux souches de *Serratia plymuthica*, par une souche de *Serratia grimesii*, une souche *Serratia fonticola* et une souche de *Serratia marcescens*.

5.3.4.2. Le métatranscriptome est caractérisé par trois profils d'expression

Les données d'abondance (normalisées sur la médiane) ont ensuite été converties en logarithme décimal afin de comparer les abondances des transcriptomes selon les différents échantillons. Trois groupes ont pu être distingués selon leurs profils de réponse transcriptomique (Figure 24) : les transcriptomes dominants (A), les transcriptomes sous-

dominants (B) et les transcriptomes faiblement exprimés (C). La population A est composée de *Lactobacillus sakei* (les 7 souches), *Lactobacillus curvatus*, *Serratia proteamaculans* (2 souches), *Serratia liquefaciens* (2 souches) et *Lelliottia amnigena* (1 souche). Les transcriptomes de ces espèces sont abondants, quels que soient les échantillons, de 5,6 à 4,5 $\log_{10}$ nombre de reads en moyenne par référence. La population B est caractérisée par des espèces bactériennes dont l'abondance totale des transcriptomes est plus faible, de l'ordre de 3,7 $\log_{10}$ nombre de reads et certains de ces transcriptomes ont des abondances très hétérogènes selon les échantillons. C'est le cas de *Lactococcus piscium* qui est très abondant dans le lot B06 alors qu'il est faiblement exprimé dans le lot B04. Enfin, les transcriptomes du groupe C sont faiblement exprimés dans tous les échantillons, avec en moyenne moins de 3,0 $\log_{10}$ reads par référence génomique.

Nous avons ensuite déterminé l'influence des conditions expérimentales (teneur en sel et type de conditionnement) sur l'abondance d'expression des transcriptomes. Sur les données présentées dans la Figure 24 nous pouvons clairement identifier une distinction des quatre lots de fabrication (B04, B05, B06 et B07). Il y a une plus grande variation d'expression entre les lots qu'entre les deux conditions expérimentales testées. Le lot B04 est nettement plus riche en *Enterobacteriaceae* que les autres lots et notamment en ce qui concerne le groupe B (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Raoultella*), tandis que l'abondance des *Serratia* spp. est plus faible dans le lot B05 au profit des autres souches de *Lactobacillus*. Par ailleurs, ce lot (B05) se distingue par une activité transcriptionnelle plus élevée de *Lactobacillus oligofermentans*. Le lot B06 est caractérisé par l'abondance élevée des trois souches de *Lactococcus piscium*. Le premier facteur discriminant est le lot de fabrication.

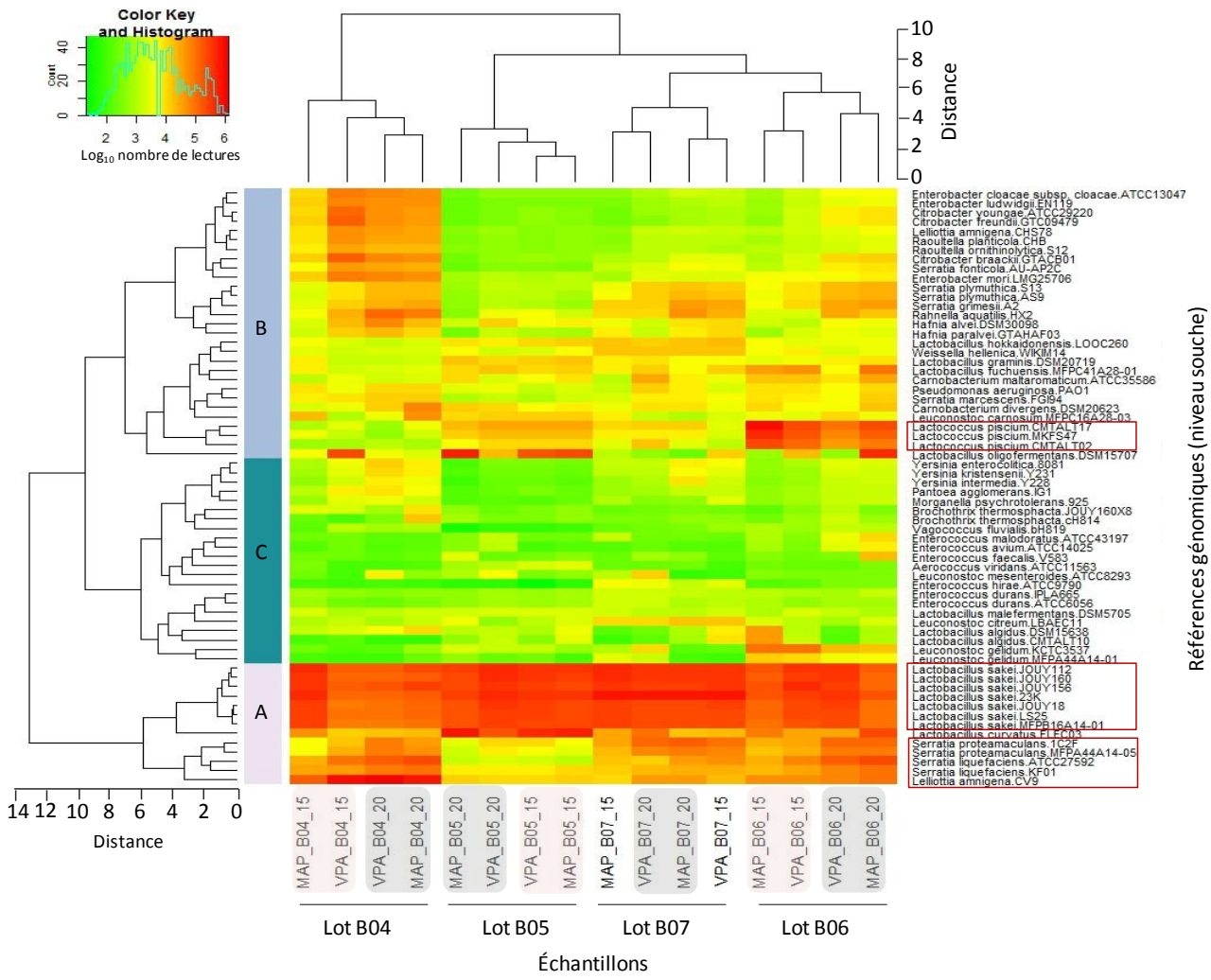


Figure 24 : classification hiérarchique des métatranscriptomes

La Figure 24 présente la relation entre les 16 échantillons, et l'abondance relative des transcriptomes associés aux références génomiques (en $\log_{10}$ du nombre de lectures). L'identité des références génomiques est présentée sur la droite de la figure et l'identité des échantillons est présentée en bas de la figure. Les références génomiques sont groupées en trois populations A, B et C, selon leur abondance. La couleur indique l'abondance d'expression de chaque référence génomique, allant du vert pour les références génomiques faiblement exprimées au rouge pour les références génomiques fortement exprimées. Le lot de fabrication est indiqué par la lettre B suivi du numéro de lot. Au sein de chaque lot de fabrication les cadres roses regroupent les échantillons à 1,5 % de NaCl et les cadres gris regroupent les échantillons à 2,0 % de NaCl.

La concentration en sel (15 : 1,5 % de NaCl ; 20 : 2,0 % de NaCl) est le deuxième facteur qui discrimine le métatranscriptome. En effet, au sein de chaque lot de fabrication, il est possible de dissocier les deux teneurs en sel (cadres gris et roses, Figure 24). Enfin, le type de conditionnement (MAP : sous atmosphère modifiée 50 % CO_2 + 50 % N_2 et VPA : sous vide) ne semble pas influer l'expression des transcriptomes après 21 jours de conservation.

Cette analyse discriminante, à l'échelle de la souche bactérienne, met donc en évidence un fort effet lot suivi d'un effet de la teneur en sel. L'effet du packaging sur l'abondance des transcriptomes n'est pas visible.

5.3.5. Après 21 jours de conservation, la communauté bactérienne des chipolatas est toujours très active métaboliquement

Afin de caractériser à l'échelle de la fonction, les activités transcriptionnelles de l'écosystème bactérien dans les chipolatas, nous avons extrait les informations d'abondance pour les 227 383 gènes des 64 souches bactériennes. L'alignement des séquences d'ARN contre ce catalogue des gènes a permis d'identifier 146 082 gènes exprimés, soit 64 % des gènes du métagénome. Parmi ces gènes, plus de 86 % sont très faiblement exprimés (< 100 séquences) et 9 % sont faiblement exprimés (de 100 à 1 000 séquences). Parmi les informations disponibles dans le catalogue de gènes, nous avons extrait la classification fonctionnelle de chacun des gènes exprimés. Cette classification résulte de l'annotation automatique à partir de la base de données COG (Clusters of Orthologous Groups, Tatusov *et al*., 2000). Plus de 50 % des gènes détectés, quels que soient les échantillons, ont été assignés à une fonction biologique connue (Figure 25), le reste étant des gènes de fonction inconnue ou des gènes de fonction générale, mais très mal caractérisée. Parmi les gènes dont une catégorie fonctionnelle a pu être attribuée, 39 % d'entre eux correspondent à des gènes impliqués dans des métabolismes dits primaires (e.g. métabolisme des acides aminés, métabolisme des

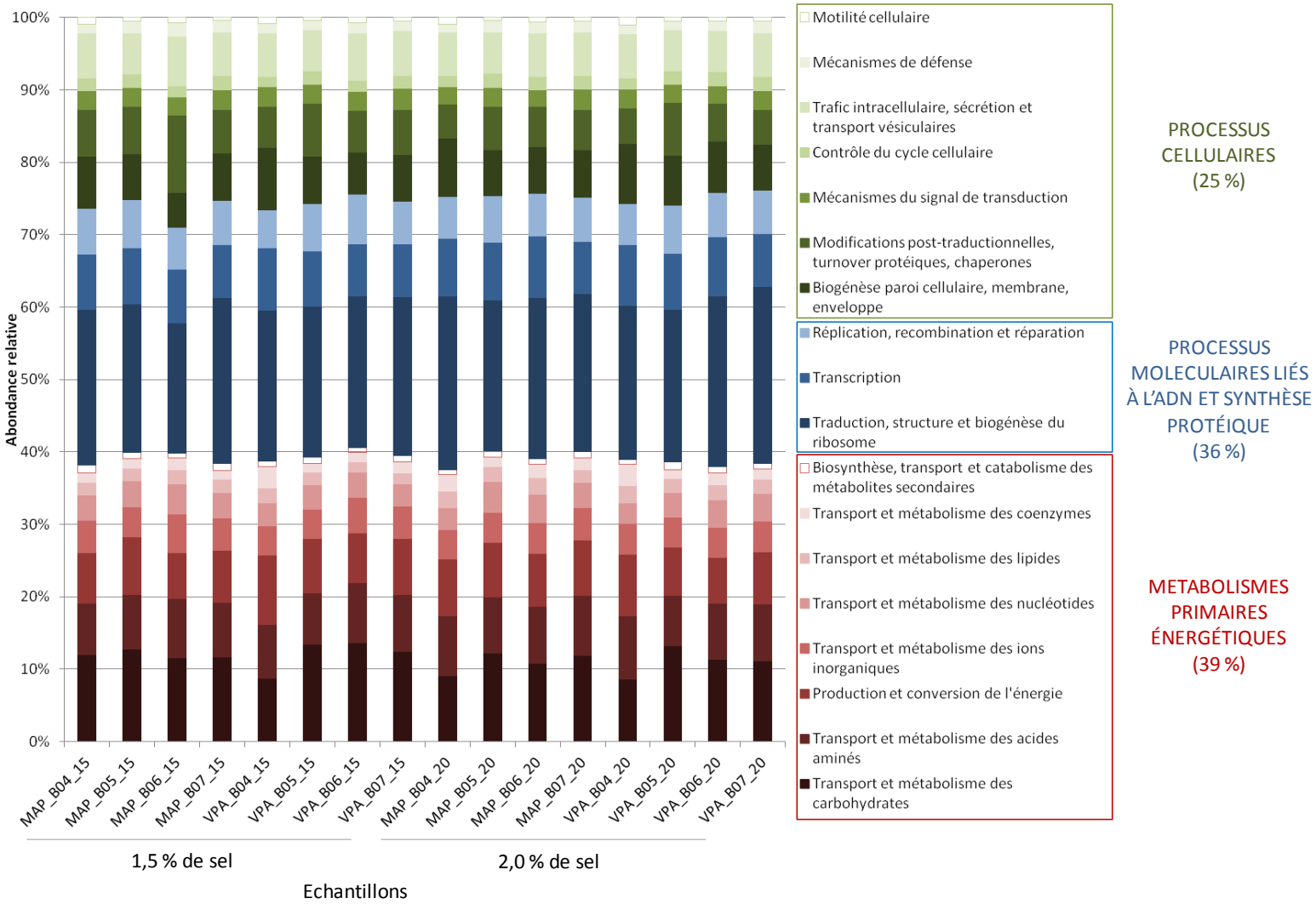


Figure 25 : classification fonctionnelle des gènes exprimés du métagénome après 21 jours de conservation

carbohydrates), 36 % des gènes exprimés sont impliqués dans les processus de transcription et traduction et enfin 25 % des gènes sont associés aux processus cellulaires.

Ces résultats soulignent qu'après 21 jours de conservation, les cellules bactériennes sont toujours très actives, avec une forte activité métabolique énergétique et une forte activité de traduction. Cependant, à ce niveau d'analyse, il n'y a pas de différence observée selon les conditions expérimentales.

5.3.6. Réponses transcriptionnelles de la communauté bactérienne à la réduction de la teneur en sel dans les chipolatas

5.3.6.1. Conditions de l'analyse différentielle

L'analyse différentielle a été réalisée au niveau (1) des gènes exprimés par le métagénome, (2) des gènes exprimés par les souches de *L. sakei* et (3) des gènes exprimés par les souches de *Serratia* spp. Pour ces deux transcriptomes (*L. sakei* et *Serratia* spp.), nous avons choisi de regrouper les gènes orthologues, c'est-à-dire de regrouper les gènes identiques au sein d'un même groupe de gènes appelé cluster. Par exemple, l'abondance du gène *ldh* correspond à la somme des abondances des 7 gènes *ldh* des différentes souches de *L. sakei* (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.3 pour plus de précisions). Cette démarche d'analyser les gènes exprimés par *L. sakei* et par *Serratia* spp. de manière séparée, a été entreprise pour trois raisons principales. Premièrement, cela permet d'identifier des différences d'expression pour des gènes faiblement exprimés, alors que ces différences d'expression seraient masquées dans le métagénome. En effet, lors de l'analyse différentielle réalisée avec l'outil DESeq2, les données d'abondance de gènes sont normalisées sur la moyenne géométrique d'expression du gène et sur la profondeur de séquençage par échantillon (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.3.4.1 pour plus de précisions) alors que la profondeur de séquençage se trouve réduite dans les deux catalogues où seuls les gènes

orthologues des espèces considérées sont comptabilisés. Deuxièmement, la création de clusters de gènes orthologues permet d'augmenter l'abondance des gènes orthologues à l'échelle de l'espèce. Et troisièmement, on s'affranchit des écarts d'abondance de l'espèce (ou du genre) considérée et observée entre les lots. Il s'agit donc d'obtenir deux informations différentes, l'une à l'échelle du métatranscriptome et l'autre à l'échelle du transcriptome de chacune des deux espèces majoritaires.

Le regroupement des gènes orthologues des 7 souches bactériennes de *L. sakei*, à 95 % d'identité (sur la base des séquences nucléotidiques) a permis d'identifier 3 202 clusters de gènes orthologues dont 1 179 clusters de gènes constituent le génome conservé (clusters de gènes orthologues communs aux sept souches) et 2 023 constituent le génome variable (clusters de gènes orthologues spécifiques d'une ou plusieurs des sept souches). L'alignement des séquences d'ARN contre ce catalogue de gènes a permis d'identifier 3 152 gènes exprimés, soit plus de 98 % du transcriptome de *L. sakei*. Toutefois, parmi ces gènes, 16 % sont très faiblement exprimés (< 100 reads), 19 % sont faiblement exprimés (< 1 000), 36 % sont moyennement exprimés (< 10 000 reads), 23 % sont fortement exprimés (< 100 000 reads) et 2 % sont très fortement exprimés (> 100 000 reads). Ces résultats indiquent que seulement 61 % des gènes (soit 1 923 gènes) du pangénome des sept souches sont exprimés de manière significative.

Le regroupement des gènes orthologues des 9 souches bactériennes de *Serratia* spp. à 80 % d'identité (sur la base des séquences protéiques) a permis d'identifier 15 061 clusters de gènes orthologues dont 1 817 clusters de gènes orthologues constituent le génome conservé et 13 244 constituent le génome variable. L'alignement des séquences d'ARN contre ce catalogue de clusters de gènes orthologues a permis d'identifier 10 731 gènes exprimés, soit plus de 70 % du transcriptome de *Serratia* spp. Parmi ces gènes exprimés, 64 % sont très faiblement exprimés (< 100 reads), 28 % sont faiblement exprimés (< 1 000 reads), 4 % sont

moyennement exprimés (< 10 000 reads) et 0,2 % sont fortement exprimés (> 10 000 reads) à l'échelle du métagénome. Toutefois, le transcriptome des *Serratia* spp. étant 5 fois moins abondant que celui de l'espèce *L. sakei*, on peut estimer qu'environ 32 % des gènes du pangénome de *Serratia* sont exprimés de manière significative.

5.3.6.2. Effet des conditions expérimentales sur les niveaux d'expression des gènes du métagénome, de *L. sakei* et de *Serratia* spp.

- L'atmosphère de conditionnement ne modifie pas l'expression des gènes à 21 jours de conservation à 8 °C.

Aucun cluster de gènes orthologues différentiellement exprimé ($p < 0,05$) n'a pu être identifié aux trois niveaux d'analyse réalisés : gènes du métatranscriptome, clusters de gènes orthologues de *L. sakei* et clusters de gènes orthologues de *Serratia* spp. Ces résultats soulignent que l'atmosphère de conditionnement ne semble pas affecter les fonctions exprimées par l'écosystème bactérien après 21 jours de conservation.

- La teneur en sel modifie l'expression des gènes à 21 jours de conservation à 8 °C

Quand la teneur en sel dans les chipolatas est réduite, 291 gènes du métatranscriptome sont différentiellement exprimés ($p < 0,05$) dont 290 sont sous-exprimés et 1 gène est sur-exprimé (Figure 26A), 36 clusters de gènes de *L. sakei* sont différentiellement exprimés ($p < 0,05$) dont 22 sont sous-exprimés et 14 sont sur-exprimés (Figure 26B) et 70 clusters de gènes de *Serratia* sont différentiellement exprimés ($p < 0,05$) dont 34 sont sous-exprimés et 36 sont sur-exprimés (Figure 26C).

Les résultats de cette analyse soulignent que seul le sel influe sur l'expression des gènes à 21 jours de conservation. Dans la suite des analyses, nous nous sommes focalisés sur cette condition expérimentale.

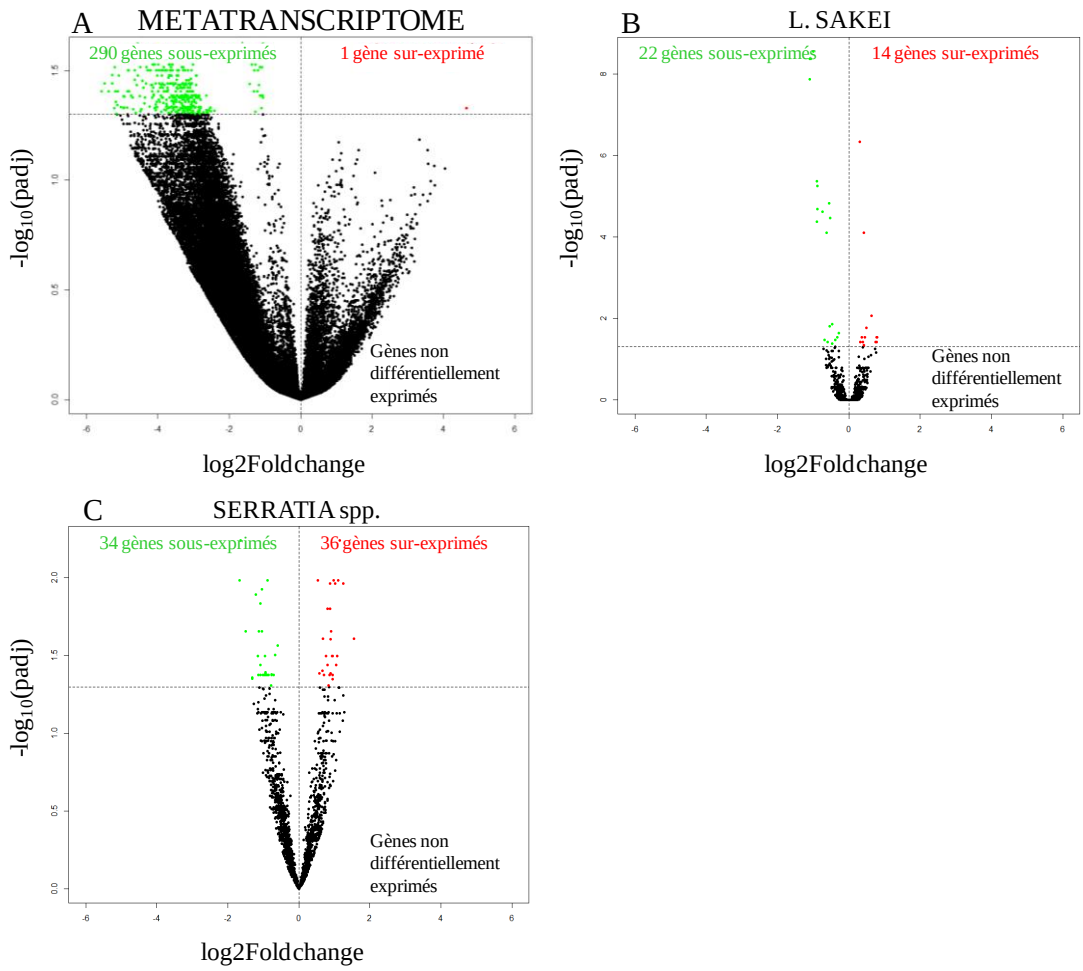


Figure 26 : dispersion de l'expression différentielle des gènes du métatranscriptome (A), des clusters de gènes orthologues de *L. sakei* (B) et des clusters de gènes orthologues de *Serratia* (C)

Légende : les diagrammes présentent le niveau de significativité du différentiel d'expression, exprimé en logarithme décimal de la p-valeur ajustée (par la méthode Benjamini-Hochberg), en fonction du facteur d'expression, exprimé en logarithme binaire du fold-change. La référence pour l'analyse différentielle est la teneur 2,0 % de NaCl ; ainsi, les gènes sont sous-exprimés (log2FC négatif, gènes présentés en vert) ou sur-exprimés (log2FC positif, gènes présentés en rouge) quand la teneur en sel est réduite (2,0 % NaCl *vs* 1,5 % de NaCl). Les gènes non différentiellement exprimés à 5 % selon la teneur en sel sont présentés en noir.

Observations : de manière intéressante, le nombre de gènes différentiellement sous-exprimés au sein des transcriptomes seuls de *L. sakei* et *Serratia* est plus faible que le nombre de gènes différentiellement sous-exprimés dans le métagénome et le nombre de gènes différentiellement sur-exprimés est plus élevé que le nombre de gènes différentiellement sur-exprimés dans le métagénome.

5.3.6.3. La réduction de la teneur en sel entraîne une diminution de la synthèse lipidique chez *L. sakei* et *Serratia* spp.

L. sakei est l'espèce dont le transcriptome est le plus abondant après 21 jours de conservation à 8 °C. L'analyse différentielle des clusters de gènes orthologues de cette espèce a révélé que la réduction de la teneur en sel modulait l'expression que de 36 gènes qui sont principalement sous-exprimés. Parmi eux, 3 gènes sont impliqués dans les processus cellulaires : *rnhC*, *uvrA2* (réplication) et *primA* (traduction) ; 4 gènes sont impliqués dans le métabolisme des nucléotides : *purB1*, *pbuG* et *adeC2* et 2 gènes sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés : *lsa0808* et *lsa1689*. En termes de fonctions métaboliques, la réduction de la teneur en sel affecte la synthèse d'acides gras à partir d'acétyl-CoA chez *L. sakei* (Figure 27). Douze gènes, faisant partie du même opéron, impliqués dans cette voie sont sous-exprimés (Tableau 9) : *accABCD* (acetyl-CoA carboxylase), *fabZ1* (β-hydroxyl-ACP dehydratase), *fabD* (malonyl-CoA : ACP transacylase), *fabG* (β-ketoacyl-ACP réductase), *fabF* (β-ketoacyl-ACP synthase II), *fabZ* (β-hydroxyl-ACP dehydratase), *fabI* (trans-2-enoyl-ACP reductase), *birA1* (biotin-[acetyl-CoA carboxylase] ligase), et *bioY* (biotin transporter). Cette voie n'est complète qu'avec l'intégration de *fabH* (β-ketoacyl-ACP synthase III) et *accP* (acyl carrier protein). Ces deux gènes ne sont pas différentiellement exprimés au seuil de significativité fixé ($p < 0,05$), cependant les facteurs d'expression indiquent une tendance similaire de sous-expression comme les autres gènes de l'opéron. Au regard du nombre de séquences (abondance), ce métabolisme correspond à la classe des gènes moyennement exprimés (< 10 000 lectures). Cette baisse de la synthèse lipidique chez *L. sakei* est également mise en évidence à l'échelle du métagénome, 18 gènes de différentes souches de *L. sakei* sont également sous-exprimés (Tableau 9).

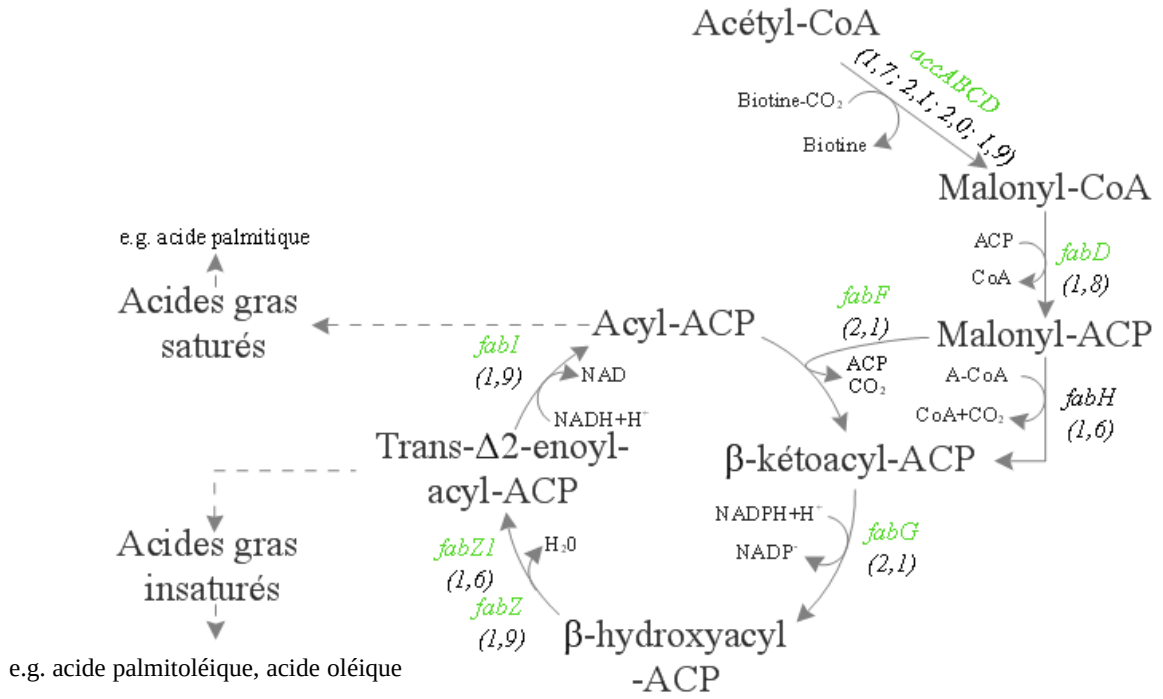


Figure 27 : voie de la synthèse d'acides gras chez *L. sakei*

Voie de synthèse d'acides gras chez *L. sakei*, en anaérobie, à partir d'acétyl-CoA. Les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$) quand la teneur en sel est réduite sont indiqués en vert, les gènes non différentiellement exprimés sont indiqués en noir. Les facteurs de sous-expression sont indiqués en dessous de chaque nom de gène.

Le complexe acétyl-coenzyme A (*accABCD*) initie la formation de malonyl-ACP à partir de l'acétyl-CoA, en utilisant la biotine comme cofacteur de réaction. La coenzyme A (CoA) est ensuite remplacée par une acyl-carrier protéine (ACP) par *fabD*. L'initiation de la synthèse d'acides gras est induite par *fabH* qui condense de l'acétyl-CoA (A-CoA) avec le malonyl-ACP pour former le β-kétoacyl-ACP. L'élongation de la synthèse d'acide gras est effectuée par *fabG* qui synthétise le β-hydroacyl-ACP à partir du β-kétoacyl-ACP. Ce β-hydroacyl-ACP est ensuite déshydraté par *fabZ* puis une deuxième déshydratation du trans-Δ2-enoyl-acyl-ACP par *fabI* conduit à la formation d'acyl-ACP. Des cycles supplémentaires d'élongation commencent par l'ajout d'un groupe acyl-ACP au malonyl-ACP par *fabF*. Le β-kétoacyl-ACP résultant peut continuer le cycle d'élongation par *fabG* à nouveau.

Tableau 9 : gènes de *L. sakei* impliqués dans la biosynthèse des acides gras, différentiellement exprimés selon la teneur en sel

Nom du gène[a]	Annotation automatique du produit	Analyse différentielle *L. sakei*[b]			Analyse différentielle métagénome[c]		
		Locus-tag[d]	Facteur[e]	Abondance totale	Locus-tag[f]	Facteur	Abondance totale
accA	acetyl-CoA carboxylase sbA	LSA0822	1,7	4886	-	-	-
		-	-	-	LSAJ160_v1_130112	2,1	861
accB	acetyl-CoA carboxylase sbB	LSA0818	2,1	3094	LSA0818	2,7	636
		-	-	-	LSAJ112_v1_140162	2,5	587
accC	acetyl-CoA carboxylase sbC	LSA0820	2,0	7883	LSA0820	2,1	1519
		-	-	-	LSAJ112_v1_140164	2,2	1564
		-	-	-	LSAJ156_v1_250044	2,1	1422
		-	-	-	LSAJ160_v1_130110	2,1	1331
		-	-	-	LSAJ18_v1_120113	2,1	1381
accD	acetyl-CoA carboxylase sbD	LSA0821	1,9	4491	LSA0821	2,2	790
		-	-	-	LSAJ156_v1_250045	2,3	684
fabD	malonyl-CoA:ACP transacylase	LSA0815	1,9	5876	-	-	-
acpP	acyl carrier protein	LSA0814	1,6	2082	-	-	-
fabH	β-ketoacyl-ACP synthase III	LSA0813	1,6	7763	-	-	-
fabG	β-ketoacyl-ACP reductase	LSA0816	2,1	4257	-	-	-
		-	-	-	LSAJ112_v1_140160	2,1	888
		-	-	-	LSAJ156_v1_250040	2,6	720
fabZ	β-hydroxyl-ACP dehydratase	LSA0819	1,9	3081	-	-	-
		-	-	-	LSAJ112_v1_140163	2,2	537
fabZ1	malonyl-CoA:ACP transacylase	LSA0812	1,6	5351	-	-	-
fabI	trans -2-enoyl-ACP reductase	LSA0823	1,9	6136	-	-	-
fabF	β-ketoacyl-ACP synthase II	LSA0817	2,1	6706	LSA0817	2,4	1196
		-	-	-	LSAJ112_v1_140161	2,2	1198
		-	-	-	LSAJ156_v1_250041	2,3	1193
		-	-	-	LSAJ160_v1_130107	2,2	1101
		-	-	-	LSAJ18_v1_120110	2,5	1078
birA1	biotin-[Acetyl-CoA carboxylase] ligase	LSA0824	1,5	7384	-	-	-
bioY	biotin transporter	LSA0825	1,4	5361	-	-	-

[a] Les gènes indiqués en vert sont les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$) et les gènes indiqués en gris sont les gènes sous-exprimés ($0,05 < p < 0,1$)
[b] Analyse différentielle des clusters de gènes orthologues de *L. sakei*
[c] Analyse différentielle des gènes du métagénome
[d] Le locus-tag des clusters de gènes orthologues correspondent au locus-tag de *L. sakei* 23K
[e] Le facteur d'expression du gène (ou cluster de gènes orthologues) entre les deux teneurs en sel
[f] Les locus-tag LSAJ160 correspondent à la souche *L. sakei* J160, LSAJ112 : souche *L. sakei* J112, LSAJ156 : *L. sakei* J156 et LSAJ18 : *L. sakei* J18

La réduction de la teneur en sel dans les chipolatas entraîne également une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras chez *S. proteamaculans*. L'ensemble des gènes de cette voie de synthèse est sous-exprimé (Tableau 10, Figure 28), *accCD*, *fabA* (β-hydroxydecanoyl thioester dehydrase), *fabB* (β-ketoacyl-ACP synthase I), *fabDFH*, *ycik* (putative β-ketoacyl-ACP reductase) et *plsX* (phosphate:acyl-ACP acyltransferase). Les gènes *accAB* et *fabGZ* ne sont pas différentiellement exprimés au seuil fixé ($p < 0,05$), cependant les facteurs d'expression indiquent une tendance similaire de sous-expression. Par contre, à l'inverse de *L. sakei*, c'est dans le métagénome que les différences d'expression des gènes de cette voie sont visibles (Tableau 10).

Tableau 10 : gènes de *Serratia* spp. impliqués dans la biosynthèse des acides gras, différentiellement exprimés selon la teneur en sel

Nom du gène[a]	Annotation automatique du produit	Analyse différentielle *Serratia* spp.[b]			Analyse différentielle métagénome[c]		
		Locus-tag	Facteur[d]	Abondance totale	Locus-tag[e]	Facteur	Abondance totale
accA	acetyl-CoA carboxylase				SPRA44_v1_600017	8,0	149
accB	acetyl-CoA carboxylase				SPR1C2F_v1_790019	7,6	216
					SPRA44_v1_750016	11,3	67
accC	biotin carboxylase				SPR1C2F_v1_790020	9,8	259
					SPRA44_v1_750017	8,6	196
accD	acetyl-CoA carboxylase				SPR1C2F_v1_570023	15	246
fabA	β-hydroxydecanoyl thioester dehydrase	SPRA44_v1_240153	2,2	1216	SPR1C2F_v1_120095	14	483
fabB	β-ketoacyl-ACP synthase I				SPR1C2F_v1_570056	9,1	826
fabD	malonyl-CoA-ACP transacylase				SPR1C2F_v1_270051	8,4	213
fabF	β-ketoacyl-ACP synthase II				SPR1C2F_v1_270055	12,2	564
					SPRA44_v1_260054	10,1	322
fabG	β-ketoacyl-ACP reductase				SPR1C2F_v1_270052	6	465
fabH	β-ketoacyl-ACP synthase III				SPRA44_v1_260050	8,7	109
fabZ	β-hydroxyacyl-ACP deshydratase				SPR1C2F_v1_650006	6,5	272
plsX	phosphate:acyl-ACP acyltransferase	SEMARFGI94_1813	1,9	1365			
yciK	putative β-ketoacyl -ACP reductase				SPR1C2F_v1_390149	16,8	99

[a] Les gènes indiqués en vert sont les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$) et les gènes indiqués en gris sont les gènes sous-exprimés ($0,05 < p < 0,1$)
[b] Analyse différentielle des clusters de gènes orthologues de *Serratia* spp.
[c] Analyse différentielle des gènes du métagénome
[d] Le facteur d'expression du gène (ou cluster de gènes orthologues) entre les deux teneurs en sel
[e] Les locus-tag LSAJ160 correspondent à la souche *L. sakei* J160, LSAJ112 : souche *L. sakei* J112, LSAJ156 : *L. sakei* J156 et LSAJ18 : *L. sakei* J18

Enfin, ce phénomène de diminution de synthèse des acides gras a également été observé chez d'autres souches bactériennes du métagénome, *Citrobacter braackii* GTACB01, *Enterobacter ludwigii* EN119 et *Carnobacterium divergens* DSM20263 (Tableau 11), mais avec une identification très partielle du nombre de gènes en raison de la plus faible abondance de ces espèces.

Tableau 11 : gènes du métagénome impliqués dans la biosynthèse des acides gras, différentiellement exprimés selon la teneur en sel

Nom du gène[a]	**Annotation automatique du produit**	**Analyse différentielle métagénome**[b]			**Souches bactériennes**
		Locus-tag	**Facteur**	**Abondance totale**	
accD	acetyl-CoA carboxylase	CBRB01_v1_21989	35,2	149	*C. braackii* GTACB01
fabB	β-ketoacyl-ACP synthase I	CBRB01_v1_21977	24,7	302	*C. braackii* GTACB01
		ELUEN11_v1_12406	31,1	147	*E. ludwigii* EN119
plsX	phosphate:acyl-ACP acyltransferase	CDIDSM_v1_21426	28,6	77	*C. divergens* DSM20263

5.3.6.4. La réduction de la teneur en sel entraîne la diminution de la biosynthèse des acides aminés chez *Serratia* spp.

Parmi les autres gènes du métagénome sous-exprimés quand la teneur en sel est réduite, 135 gènes sont impliqués dans les processus cellulaires, dans les processus moléculaires liés à l'ADN et à la synthèse protéique et dans la production et conversion de l'énergie des espèces minoritaires (données présentées en annexe 8.5). Ces gènes traduisent donc une activité cellulaire (de traduction, de transcription, de biosynthèse de paroi membranaire) plus importante quand la teneur en sel est normale (2,0 %). De manière

[a] Les gènes indiqués en vert sont les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$)
[b] Analyse différentielle des gènes dans le métagénome

intéressante, cela traduit une production de biomasse plus importante et cela corrobore les mesures d'abondance des espèces de *S. proteamaculans*, de *B. thermosphacta*, d'*E. avium*, d'*E. durans* ou encore de *V. fluvialis*, réalisées par qPCR et amplicons 16S (Fougy *et al.*, 2016). Toutefois, dans le cadre de cette étude, nous nous sommes surtout intéressés aux fonctions métaboliques car ce sont celles-ci qui sont le plus en lien avec l'altération.

Ainsi, quand la teneur en sel est réduite dans les chipolatas, nous avons mis en évidence une baisse de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés de *Serratia* spp. dans le métagénome et en particulier les souches *S. proteamaculans* 1C2F et MFPA44A14-05 (Tableau 12). Les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$) sont ceux impliqués dans la synthèse de l'arginine : *argG* (arginiosuccinate synthase), *artI* (arginine transporter), *artP* (arginine transporter) ; de la synthèse de la tyrosine et de la phénylalanine : *aroG* (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate -7-phosphate synthase), *aroB* (3-dehydroquinate synthase), *aroQ* (3-dehydroquinate dehydratase) ; de la synthèse de l'histidine : *hisG (*ATP phosphoribosyltransferase*), hisJ* (Histidine-binding protein) ; de la synthèse de la valine : *ilvG* (Acetolactate synthase isozyme 2 large subunit), *ilvC* (ketol-acid reductoisomerase) et de la synthèse de la lysine : *lysA* (diaminopimelate decarboxylase) et *lysC* (aspartokinase III). Parmi les gènes impliqués dans ces voies de synthèse, certains ne sont pas différentiellement exprimés au seuil de significativité fixé (5 %) car l'abondance des gènes restent faibles, mais les facteurs de sous-expression sont importants, de 5 à 44 fois moins exprimés quand la teneur en sel est réduite.

Tableau 12 : gènes de *Serratia* spp. impliqués dans la biosynthèse des acides aminés

Nom du gène[a]	Annotation automatique du produit	Analyse différentielle métagénome[b]		
		Locus-tag[c]	Facteur	Abondance totale
Arginine/Ornithine				
argA	amino-acid acetyltransferase	SPR1C2F_v1_650040	9,6	342
		SPRA44_v1_600056	9,0	88
argB	acetylglutamate kinase	SGRA2_v1_860004	18,2	36
		SPR1C2F_v1_880012	10,9	43
argC	N-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase	SPR1C2F_v1_880013	7,7	148
argD	acetylornithine aminotransferase and succinyldiaminopimelate aminotransferase	SPR1C2F_v1_830033	9,5	152
		SPRA44_v1_760028	10,6	81
argI	ornithine carbamoyltransferase 1	SLIKF01_v1_180078	15,1	54
		SPR1C2F_v1_110169	7,3	167
argG	argininosuccinate synthase	SPR1C2F_v1_880011	10,1	233
argH	argininosuccinate lyase	SPRA44_v1_780011	6,9	96
carB	carbamoyl-phosphate	SPR1C2F_v1_160049	6,8	244
		SPRA44_v1_90045	6,0	148
artI	arginine transporter	SPR1C2F_v1_260211	10,5	223
artP	arginine transporter	SPR1C2F_v1_260212	10	346
Tyrosine/Phénylalanine				
aroB	3-dehydroquinate synthase	SPR1C2F_v1_830057	9,4	534
aroG	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate -7-phosphate synthase	SPRA44_v1_170049	8,4	75
aroQ	3-dehydroquinate dehydratase, type II	SPRA44_v1_750015	9,6	126
aroK	shikimate kinase I	SGRA2_v1_760010	7,2	352
		SPLS13_24000	12,2	47
		SPR1C2F_v1_830058	6,9	647
		SPRA44_v1_760049	8,3	532
pheA	secreted chorismate mutase	SPR1C2F_v1_300018	7,0	34
tyrB	tyrosine aminotransferase	SPRA44_v1_750043	6,7	54
Histidine				
hisA	N-(5'-phospho-L-ribosyl-formimino)-5-amino-1-(5'-phosphoribosyl)-4-imidazolecarboxamide isomerase	SPR1C2F_v1_260156	9	29
hisG	ATP phosphoribosyltransferase	SPR1C2F_v1_260161	13,5	126
hisJ	histidine-binding protein	SPR1C2F_v1_170093	18,6	287
		SPRA44_v1_90156	16,4	54

[a] Les gènes indiqués en vert sont les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$), les gènes indiqués en gris sont les gènes sous-exprimés ($0,05 < p < 0,1$)
[b] Analyse différentielle des gènes du métagénome
[c] Le locus-tag SFOAUAP2C correspondant aux gènes de la souche *S. fonticola* AU-AP2C, SPRA44 : *S. proteamaculans* MFPA44A14-01, SPR1C2F : *S. proteamaculans* 1C2F, SLIKF01 : *S. liquefaciens* KF01, SGRA2 : *S. grimesii* A2, SEPLYAS9 : *S. plymuthica* AS9, SLI27592 : *S. liquefaciens* ATCC27592, SEMARFGI94 : *S. marcescens* FGI94.

Valine				
ilvC	ketol-acid reductoisomerase	SPRA44_v1_760189	16	215
ilvG	acetolactate synthase isozyme 2 large subunit	SPR1C2F_v1_860026	7,7	296
Lysine				
lysA	diaminopimelate decarboxylase	SPR1C2F_v1_650064	14,9	140
		SPRA44_v1_600096	44,9	285
lysC	aspartokinase III	SPR1C2F_v1_800043	12,4	154
asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	SPR1C2F_v1_830111	7,4	159
		SPRA44_v1_760102	6,8	55
usg	putative semialdehyde dehydrogenase	SPRA44_v1_520043	5,4	60
dapA	dihydrodipicolinate synthase	SPRA44_v1_570026	5,7	229
dapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	SPR1C2F_v1_650020	6,5	198
argD	bifunctional acetylornithine succinyldiaminopimelate aminotransferase	SPR1C2F_v1_830033	9,5	152
		SPRA44_v1_760028	10,7	81
dapF	diaminopimelate epimerase	SPR1C2F_v1_60040	6,6	257

5.3.6.5. Peu de gènes de *L. sakei* sont sur-exprimés quand la teneur en sel est réduite

Parmi les gènes différentiellement exprimés, certains gènes de *L. sakei* spp. (Tableau 13) sont sur-exprimés quand la teneur en sel est réduite.

Tableau 13 : clusters de gènes orthologues de *L. sakei* sur-exprimés dans les chipolatas à teneur réduite en sel

Nom du gène[a]	**Annotation automatique du produit**	**Analyse différentielle *L. sakei*[b]**		
		Locus-tag[c]	**Facteur**[d]	**Abondance totale**
Processus cellulaires				
clpX	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	LSA1061	1,3	87 876
mnmA	tRNA 2-thiouridylase	MFPB16_v1_0868	1,4	27 027
pedC	pediocin PA-1 biosynthesis protein PedC	LSAJ23_v1_p0067	1,7	31 599

[a] Les gènes indiqués en rouge sont les gènes sur-exprimés ($p < 0,05$)
[b] Analyse différentielle des clusters de gènes orthologues de *L. sakei*
[c] Le locus-tag LSA des clusters de gènes orthologues correspondent au locus-tag de la souche *L. sakei* 23K, le locus-tag MFPB16 : *L. sakei* MFPB16A14-01, LSAJ23 : *L. sakei* JOUY23 et LSAJ112 : *L. sakei* JOUY112. La présence d'un 'p' dans le locus tag indique qu'il s'agit d'un gène présent sur un plasmide
[d] Le facteur d'expression du cluster de gènes orthologues entre les deux teneurs en sel

rex	redox-sensing transcriptional repressor Rex	LSA0848	1,5	3792
rpsA	30S ribosomal protein S1	LSA1017	1,2	127 068
Métabolisme des carbohydrates				
lsaJ23_v1_p0054	glucose -6-phosphate isomerase (fragment)	LSAJ23_v1_p0054	1,7	31 192
lsaJ23_v1_p0080	tagatose 1,6-diphosphate aldolase (fragment)	LSAJ23_v1_p0080	1,7	35 310
Métabolisme des acides aminés				
lsaJ23_v1_p0087	MFS transporter permease	LSAJ23_v1_p0087	1,4	10 298
lsaJ112_v1_170001	putative ABC transporter	LSAJ112_v1_170001	1,3	12 459
lsa0311	glutamate/aspartate:cation symporter	LSA0311	1,3	8957

Les clusters de gènes orthologues de *L. sakei* impliqués dans le métabolisme des carbohydrates ne sont que des fragments de gènes qui se situent sur le plasmide de la souche *L. sakei* J23 et ceux impliqués dans le métabolisme des acides aminés sont mal caractérisés. Ainsi, nous n'avons pas inclus dans notre analyse ces quelques gènes sur-exprimés de *L. sakei*.

5.3.6.6. Le métabolisme glucidique de *Serratia* et la dégradation du pyruvate augmentent avec la réduction de la teneur en sel

Par contre, chez *Serratia* spp., à l'exception de quelques gènes sur-exprimés impliqués dans des processus cellulaires, de nombreux autres gènes sur-exprimés sont impliqués dans le métabolisme énergétique des carbohydrates et de la dégradation du pyruvate (Tableau 14). L'ensemble de ces voies cataboliques est présenté dans la Figure 28 et la description des gènes est présente dans le Tableau 14. Parmi ces gènes, le gène *frdA* (fumarate reductase) qui oxyde le fumarate en succinate en condition anaérobie et le complexe *sdhA* (succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit), *sdhB* (succinate dehydrogenase, iron-sulfur subunit) et *sdhC* (succinate dehydrogenase, iron-sulfur subunit) qui fait la réaction inverse, en condition aérobie sont sur-exprimés. De plus, certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse sont sur-exprimés, *fbaAB* (fructose biphosphate aldolase), *pgk*

(phosphoglycérate kinase), *gmpI* (phosphoglycérate mutase), et *pykA* (pyruvate kinase). L'ensemble des gènes de la voie de la dégradation du *N*-acétylglucosamine en fructose 6-phosphate est également sur-exprimé, *nagC* (N-acetylglucosamine repressor), *nagA* (N-acetylglucosamine -6-phosphate deacetylase), *nagE* (N-acetyl glucosamine transporter), *nagB* (glucosamine -6-phosphate deaminase). De plus, les espèces de *Serratia* spp. sont impliquées dans la fermentation anaérobie du pyruvate, 4 gènes de cette voie sont sur-exprimés, *pflB* (pyruvate formate lyase I), *adhE* (pyruvate-formate lyase deactivase), *fdhD* (formate dehydrogenase) et *yiaY* (Fe-containing alcohol dehydrogenase) et *pflB* et *adhE* sont très fortement exprimés (> 10 000 reads). Les gènes qui codent pour Pta (phosphate acétyltransférase) et AckA (acétate kinase), qui convertissent successivement l'acétyl-CoA en acétate, ne sont pas différentiellement exprimés. Cependant, il faut noter que ces enzymes sont très probablement actives, car les gènes qui codent pour ces enzymes sont présents en nombre de séquence supérieure à $3\log_{10}$ (classe de gènes moyennement exprimés). Enfin, un autre couple de gènes impliqués dans la dégradation du pyruvate est sur-exprimé. Il s'agit des gènes *aceE* (pyruvate dehydrogenase) *et aceF* (dihydrolipoamide acetyltransferase), impliqués dans la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA, qui intègre ensuite le cycle de Krebs. En plus de ces voies cataboliques, une voie anabolique est sur-exprimée : l'opéron contenant les gènes *deoA* (thymidine phosphorylase), *deoB* (phosphopentomutase) et *deoC* (2-deoxyribose -5-phosphate aldolase), qui permettent la synthèse de thymidine à partir du glycéraldéhyde -3-phosphate, est également sur-exprimé.

Tableau 14 : clusters de gènes orthologues de *Serratia* spp. sur-exprimés dans les chipolatas à teneur réduite en sel

Nom du gène[a]	Annotation automatique du produit	Analyse différentielle *Serratia* spp.[b]		
		Locus-tag[c]	Facteur[d]	Abondance totale
Processus cellulaires				
fliD	flagellar filament capping protein	SFOAUAP2C_v1_40069	1,9	447
cpxP	periplasmic protein combats stress	SPRA44_v1_780046	1,9	652
lpp	murein lipoprotein	SPRA44_v1_300017	1,6	35 965
bolA	regulator of penicillin binding proteins and beta lactamase transcription (morphogene)	SPRA44_v1_140115	1,8	465
SEPLYAS9_4543	UvrABC system protein A	SEPLYAS9_4543	1,5	1265
npA	transposase	SPR1C2F_v1_20005	2,2	323
SPRA44_v1_780037	putative transcriptional regulator	SPRA44_v1_780037	1,9	329
Production et conversion de l'énergie				
frdA	fumarate reductase	SFOAUAP2C_v1_150126	2	3933
sdhA	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	SPRA44_v1_170016	2,0	722
sdhB	succinate dehydrogenase, iron-sulfur subunit	SPRA44_v1_170017	1,6	472
sdhC	succinate dehydrogenase, membrane subunit	SFOAUAP2C_v1_20568	2,1	329
plfB	pyruvate formate lyase	SPRA44_v1_240104	1,7	23 631
fdhD	formate dehydrogenase formation protein	SLIKF01_v1_190092	1,8	872
		SPRA44_v1_10053	1,9	1813
adhE	fused acetaldehyde-CoA dehydrogenase	SGRA2_v1_490016	1,7	10 788
yiaY	Fe-containing alcohol dehydrogenase	SPRA44_v1_590044	2,0	1924
aceE	pyruvate dehydrogenase, decarboxylase	SGRA2_v1_710033	1,6	3265
aceF	pyruvate dehydrogenase	SEPLYAS9_4213	1,8	1607
dps	Fe-binding and storage protein	SPRA44_v1_220008	1,8	24 983
Métabolisme des nucléotides				
deoA	thymidine phosphorylase	SPRA44_v1_80005	1,7	1381
deoB	phosphopentomutase	SPRA44_v1_80006	1,8	2727
deoC	2-deoxyribose -5-phosphate aldolase	SFOAUAP2C_v1_210045	1,8	668

[a] Les gènes indiqués en rouge sont les gènes sur-exprimés ($p < 0,05$) et les gènes indiqués en gris sont les gènes sur-exprimés ($0,05 < p < 0,1$)
[b] Analyse différentielle des clusters de gènes orthologues de *Serratia* spp.
[c] Le locus-tag SFOAUAP2C correspondant aux gènes de la souche *S. fonticola* AU-AP2C, SPRA44 : *S. proteamaculans* MFPA44A14-01, SPR1C2F : *S. proteamaculans* 1C2F, SLIKF01 : *S. liquefaciens* KF01, SGRA2 : *S. grimesii* A2, SEPLYAS9 : *S. plymuthica* AS9, SLI27592 : *S. liquefaciens* ATCC27592, SEMARFGI94 : *S. marcescens* FGI94.
[d] Le facteur de sous-expression du cluster de gènes orthologues entre les deux teneurs en sel

Métabolisme des carbohydrates et dégradation du pyruvate				
fbaA	fructose-bisphosphate aldolase, CII	SPRA44_v1_650015	1,8	13 232
fbaB	fructose-bisphosphate aldolase C I	SPRA44_v1_580033	1,8	361
pgk	phosphoglycerate kinase	SLI27592_20595	1,5	7422
gmpI	phosphoglycerate mutase III	SPRA44_v1_780056	1,8	885
pykA	pyruvate kinase II	SPRA44_v1_360010	1,4	1476
dhaL	dihydroxyacetone kinase	SFOAUAP2C_v1_90105	2,2	670
dhaK	dihydroxyacetone kinase sb K	SLI27592_21475	1,3	1162
nagC	transcriptional regulator/sugar kinase	SEMARFGI94_1150	1,6	545
nagA	N-acetylglucosamine -6-phosphate deacetylase	SPRA44_v1_160056	1,9	855
nagB	glucosamine-6-phosphate deaminase	SPRA44_v1_160057	2,2	967
nagE	N-acetyl glucosamine transporter	SPRA44_v1_160058	2,1	881
Métabolisme des acides aminés				
aspA	aspartate ammonia-lyase	SPRA44_v1_70012	2,2	8128

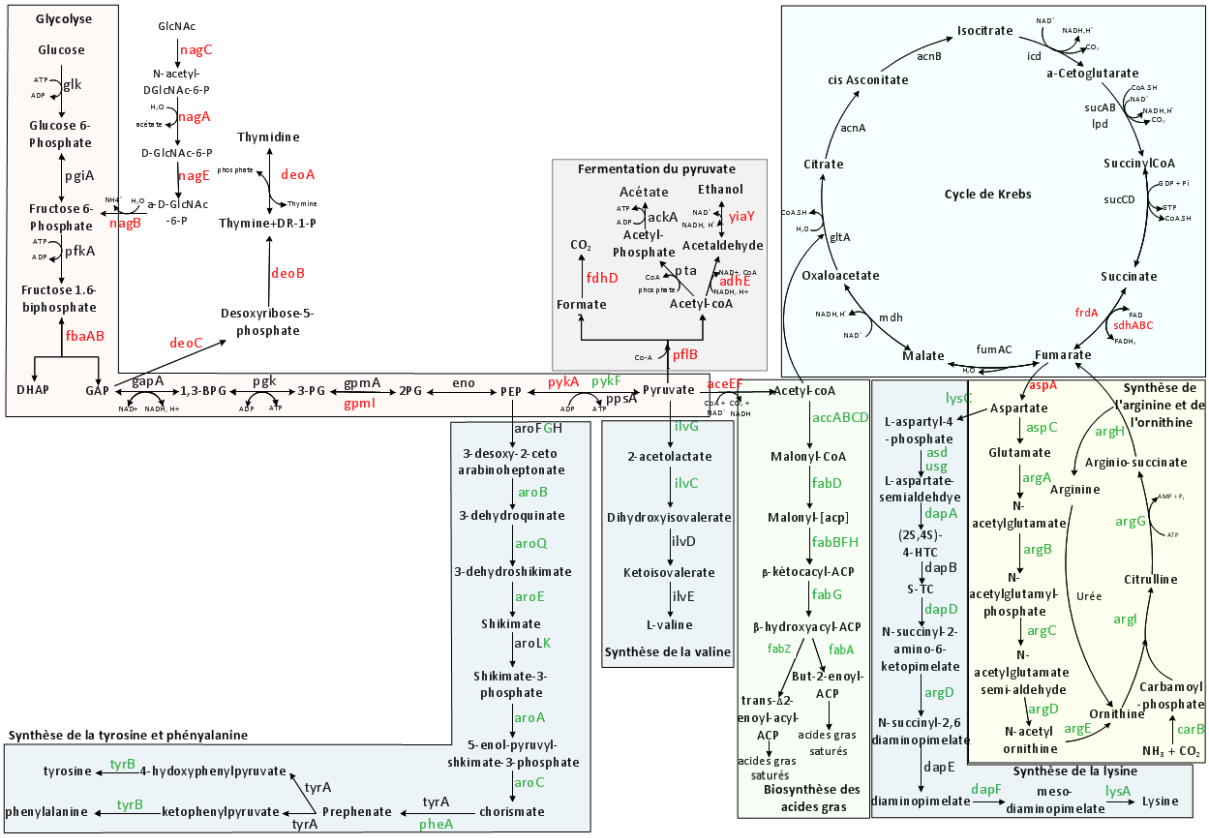


Figure 28 : principales voies métaboliques de *Serratia* dont l'expression des gènes est modulée par la teneur en sel dans les chipolatas

La Figure 28 présente les différentes voies métaboliques de *Serratia* spp. affectées par la réduction de la teneur en sel dans les chipolatas. Les gènes indiqués en vert sont les gènes sur-exprimés quand la teneur en sel est plus élevée (synthèse acides aminés et de lipides) et les gènes indiqués en rouge sont les gènes sur-exprimés quand la teneur en sel est réduite. Les gènes indiqués en noir sont les gènes non différentiellement exprimés selon la teneur en sel. Pour plus de lisibilité dans cette figure, les différents cofacteurs des voies de synthèse des acides aminés et des acides gras ne sont pas représentés, les voies de synthèse détaillées sont disponibles en annexes 8.6 à 8.10. Dans la voie de synthèse de la lysine, (2S, 4S)-4-HTC : (2S, 4S)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate et S-TC : S-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate.

5.3.7. Discussion

Les objectifs de cette étude étaient (1) d'identifier les espèces bactériennes métaboliquement actives après 21 jours de conservation, (2) d'identifier les gènes exprimés et les fonctions métaboliques affectées par la réduction de la teneur en sel et (3) de déterminer les liens entre les activités métaboliques bactériennes et les défauts d'altération observés à 21 jours de conservation.

- <u>Les activités transcriptionnelles bactériennes ne sont pas systématiquement le reflet de l'abondance de population des espèces</u>

Les travaux de l'analyse de la diversité bactérienne ont été menés en réalisant le séquençage de la région V1-V3 des gènes codant pour les ARNr 16S. En comparant les résultats d'abondance de population et les niveaux d'expression des gènes (obtenus respectivement par pyroséquençage et RNAseq), nous avons obtenu deux cas de figure. Le premier cas de figure est celui où l'activité transcriptionnelle est le reflet de l'abondance (en population) des espèces. C'est notamment le cas de *L. sakei* qui est l'espèce dominante et la plus active métaboliquement dans les chipolatas altérées. Rappelons que *L. sakei* n'est pas affectée (en termes de taux de population) par les conditions expérimentales testées. Même si son réservoir reste inconnu, la viande est l'habitat naturel de *L. sakei*. Cette espèce possède différentes propriétés qui lui permettent de croître dans les chipolatas. Elle est, entre autre, capable de croître à basse température et jusqu'à 9 % de sel (Marceau *et al*., 2003), elle est équipée d'enzymes, une superoxyde-dismutase (SodA), deux NADH oxydases (Nox), quatre péroxydases et une catalase (Chaillou *et al*., 2005) lui permettant d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène, elle est capable d'utiliser le fer présent dans la viande et enfin, elle est auxotrophe pour tous les acides aminés (Chaillou *et al*., 2005) et la viande est un substrat riche en protéines libérant des acides aminés tout au long de son vieillissement. Cette espèce

bactérienne a ainsi les capacités de résister aux pressions environnementales (sel, température, conservation) rencontrées lors de la fabrication et la conservation des chipolatas.

Dans le même cas de figure que *L. sakei*, l'abondance d'expression de *L. piscium* confirme les résultats de pyroséquençage, car cette espèce est très abondante dans un seul lot (B06) et elle est très exprimée dans ce lot.

À l'opposé de ce premier cas, le deuxième cas est celui où le niveau d'expression ne corrobore pas avec le niveau d'abondance car les niveaux d'activités transcriptionnelles sont plus élevés que ce que l'abondance de population a révélé. Ce cas de figure a été observé parmi les *Enterobacteriaceae* et plus particulièrement pour les espèces de *Serratia* spp. et *Lelliottia amnigena*. En effet, pour ces deux espèces, classées dans la population A (Figure 24), leurs activités transcriptionnelles sont très importantes. Nous pouvons faire ici l'hypothèse que l'abondance de ces espèces a probablement été sous-estimée par pyroséquençage. En effet, cette méthode de caractérisation présente plusieurs biais, d'ordre technique, qui pourraient étayer notre hypothèse de sous-estimation. L'un des premiers biais pourrait être la première étape à l'analyse de la diversité bactérienne par pyroséquençage des gènes codant pour l'ARN 16S qui est l'extraction des ADN bactériens. Au cours de cette étape, la fraction bactérienne est isolée du reste des chipolatas, par des centrifugations successives, puis les ADN bactériens sont extraits par une pré-lyse enzymatique suivie d'une lyse mécanique (cf. matériels et méthodes, paragraphes 4.3.1 et 4.3.2 pour plus de précisions). Nous pouvons supposer que la fraction bactérienne a été correctement récupérée puisque la quantification par qPCR réalisée et l'abondance relative de certaines espèces bactériennes, telle que *L. sakei*, concordent très bien (cf. résultats, paragraphe 5.2.4, supplementary file SF1). De plus, il est maintenant bien admis que la lyse cellulaire est plus difficile pour les bactéries à Gram positif, du fait de leur paroi membranaire plus épaisse, que pour les bactéries à Gram négatif. De même que pour l'efficacité de la récupération du culot bactérien, les

quantifications par qPCR et notamment celles de *Serratia* spp. supportent l'idée que le processus d'extraction réalisé était suffisamment efficace pour extraire les ADN bactériens. Nous portons donc notre hypothèse davantage sur un deuxième biais possible liée à l'amplification PCR du gène codant pour l'ARNr 16S. Dans cette étude, nous avons choisi d'amplifier la région V1-V3 (environ 500 pb). Cette région a également été choisie pour caractériser les communautés bactériennes de produits carnés et de la mer altérées (Chaillou *et al*., 2015) ou encore de produits carnés prêt-à-consommer (Pothakos *et al*., 2015). Ces régions, et principalement la région hypervariable V3, sont utilisées pour différencier les différentes espèces de *Lactobacillus* (Fettweis *et al*., 2012). Dans une étude de diagnostic de bactéries pathogènes, Chakravorty *et al*., (2007) ont montré que dans un mélange de 110 espèces bactériennes, composé d'espèces pathogènes retrouvées dans le sang ou encore des flores bactériennes environnementales, les régions V2 et V3 étaient les plus adaptées pour différencier les espèces au niveau du genre sauf pour les *Enterobacteriaceae*, phylogénétiquement très proches. Au sein de cette famille, les trois régions (V1, V2 et V3) sont très conservées et la différenciation des espèces est difficile. Pour les *Enterobacteriaceae*, les régions V4 à V6 sont moins conservées et sembleraient plus adaptées pour différencier les espèces de cette famille. Cette information nous invite à penser que lors de l'amplification PCR de la région V1-V3 très conservée pour les *Enterobacteriaceae*, la formation de séquences chimériques, séquences amplifiées pouvant ne pas provenir de la même espèce (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.4.2.3 pour plus de précisions) a du être plus importante. Or, lors de l'analyse de données de séquençage, les séquences chimériques ont été supprimées. Cette suppression de séquences pourrait expliquer la sous-estimation des *Enterobacteriaceae* observée par pyroséquençage de la région V1-V3 du gène codant pour l'ARNr 16S. Ainsi, dans cette étude, le RNAseq a permis de donner une image la plus proche

possible de la diversité bactérienne des chipolatas, puisque dans cette approche, les ARN bactériens sont séquencés sans étape préalable d'amplification.

- L'expression des gènes impliqués dans les processus cellulaires de *Serratia* spp. corrobore avec sa biomasse

Parmi les gènes sur-exprimés par le métagénome dans les chipolatas à 2,0 % de sel, par rapport aux chipolatas à 1,5 % de sel, 135 gènes sont impliqués dans les processus cellulaires et notamment dans la traduction et la transcription [dont 98 gènes (73 % des gènes) appartiennent à *Serratia* spp.]. Ces processus traduisent une activité protéique plus importante dans cette condition de sel (2,0 %) qui est le signe d'une activité cellulaire liée avec une croissance bactérienne plus importante. Cette activité protéique corrobore avec la biomasse plus importante de *Serratia* dans les chipolatas à 2,0 % de sel (mesurée en qPCR). Cette étude n'est pas la première à montrer une forte activité cellulaire de ce type dans un aliment après une période de conservation des produits alimentaires. Récemment, Monnet *et al*., (2016) ont identifié que la majeure partie des gènes exprimés par des flores technologiques utilisées dans la fabrication du Reblochon, à 35 jours d'affinage, était impliquée dans des phénomènes de traduction.

- Les différences d'altération observées à 21 jours selon le type de conditionnement ne sont pas liées à des différences d'activités transcriptionnelles bactériennes

L'objectif de ces travaux était de corréler les différences d'altération observées entre les différentes conditions expérimentales avec les fonctions métaboliques des communautés bactériennes. Les chipolatas conditionnées sous atmosphère modifiée présentaient une intensité d'altération plus importante, et les molécules odorantes produites étaient différentes par rapport aux échantillons conditionnés sous vide. Combinés à diminution significative de la richesse bactérienne, ces défauts d'altération suggéraient des activités transcriptionnelles et

métaboliques différentes entre ces deux conditions. Toutefois, l'analyse différentielle a révélé qu'aucun gène n'était différentiellement exprimé selon le type de conditionnement ; la corrélation entre les défauts d'altération et les activités transcriptionnelles de la communauté bactérienne n'a pu être établie après 21 jours de conservation. Rappelons que la stratégie expérimentale initiale consistait à comparer des chipolatas non altérées avec des chipolatas altérées à un temps donné. Or, il a été difficile d'identifier clairement un point de rupture entre les échantillons non altérés et les échantillons altérés à un temps précis, puisque l'altération s'est caractérisée par l'évolution progressive du produit dans le temps et non le changement d'état brutal de celui-ci. Nous avons donc choisi de caractériser l'altération et la diversité bactérienne en fin de vie des produits, à 21 jours de conservation, mais nous n'avons pas identifié de différences d'activités transcriptionnelles. La première hypothèse pour expliquer cette absence de corrélation se situe dans la possibilité que les différences d'activités métaboliques productrices d'odeurs aient eu lieu bien avant les 21 jours. La production d'odeurs d'altération (composés volatils) est liée à la dégradation de substrats nutritionnels présents dans la viande. Les différents composés volatils identifié dans les produits carnés sont produits séquentiellement au cours de la conservation (Casaburi *et al.*, 2015) puisque les substrats utilisés par les bactéries évoluent. Les métabolites ainsi produits s'accumulent tout au long du stockage et la caractérisation des odeurs que nous avons réalisée à 21 jours est l'image finale de ces activités métaboliques.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer que les différences d'activités transcriptionnelles productrices d'odeurs ne soient pas visibles après 21 jours est qu'il n'y ait effectivement pas de différences, que les métabolites produits soient les mêmes, mais que ces derniers réagissent différemment selon les gaz présents dans l'emballage de conditionnement. Pour pouvoir tester cette hypothèse, il faudrait, en combinaison de l'analyse transcriptionnelle, doser les métabolites produits lors de l'altération des chipolatas.

Cependant, les odeurs rances identifiées dans les chipolatas conditionnées sous vide sont plutôt dues à des aldéhydes tandis que les odeurs aigres identifiées dans les chipolatas conditionnées sous atmosphère protectrice sont plutôt liées à des acides. Dans de récents travaux, Rouger *et* al., (2016) ont étudié la réponse transcriptionnelle de la communauté bactérienne de la viande de poulet conditionnée sous différentes compositions en gaz (70 % CO_2 + 30 % de O_2 ; 50 % de CO_2 + 50 % d'O_2 ; 20 % d'O_2 et 80 % de N_2). Les auteurs ont mis en évidence des différences d'activités transcriptionnelles entre 7 et 9 jours de conservation, au sein d'un même type de conditionnement, mais entre les 3 types de conditionnement, le profil d'activités transcriptionnelles était le même. Ces données suggèrent donc que les différences d'activités métaboliques de la communauté bactérienne peuvent être initiées dès les premiers jours de conservation et notre première hypothèse (différences d'activités métaboliques durant le stockage) nous parait être la plus probable.

- <u>Il existe un lien entre les défauts d'altération mesurés dans les chipolatas à teneur réduite en sel et les fonctions métaboliques de *Serratia* spp</u>.

Bien que les différences d'altération entre les chipolatas à 2,0 % de NaCl et celles à 1,5 % étaient moindres par rapport au type de conditionnement, l'analyse différentielle a permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre ces deux conditions. Pour relier aux différences d'altération observées quand la teneur en sel était réduite, baisse de pH, production d'exsudat et production d'odeurs soufrées, nous avons identifié que *Serratia* spp. était principalement impliqué dans ces phénomènes. Le glucose est le premier substrat énergétique utilisé par les bactéries (Casaburi *et al*., 2015). Cependant, cette consommation de sucre peut être dépendante de la teneur en sel dans les chipolatas. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Casey *et al*., (2013) ont identifié que face à un stress osmotique, induit par l'ajout de 0,5 M de NaCl dans le milieu de fermentation, la levure réduisait sa consommation de glucose. Les auteurs ont également dosé les métabolites intermédiaires de la glycolyse et ont

mis en évidence que la concentration en glycéraldéhyde -3-phosphate (G3P) était plus faible en présence de NaCl. Zhong *et al*., (2016) ont également identifié une baisse des activités de la phosphofructokinase, de la pyruvate kinase, de la phosphoenolpyruvate kinase ainsi qu'une concentration en pyruvate plus faible lors de l'exposition au stress osmotique des feuilles de concombres. Enfin, Browne et Dowds (2001) ont identifié une répression de l'enzyme Gap (glycéraldéhyde -3-phosphate), suite à un stress osmotique chez *Bacillus cereus*. Ainsi, l'augmentation de la fermentation du glucose par *Serratia* dans les chipolatas à 1,5 % de sel pourrait être liée d'une part, à des conditions d'activités enzymatiques plus favorables (e.g. pas d'inhibition par le sel) et d'autre part à un stress osmotique moins important et donc la possibilité de mettre en œuvre des voies métaboliques différentes. Enfin, la fermentation du pyruvate pour produire de l'acétate chez *Serratia* spp. est très importante. Les métabolites d'altération n'ont pas été dosés lors de ces travaux, cependant, une baisse significative de pH dans les échantillons à 1,5 % de NaCl a été identifiée en lien avec l'augmentation de la production d'exsudat. Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que les espèces de *Serratia* peuvent être fortement impliquées dans l'altération des chipolatas de par leurs activités glycolitiques.

- La présence des ARN de *Sus scrofa* a limité la profondeur des analyses transcriptionnelles

Cette dégradation du glucose et les activités transcriptionnelles conduisant aux défauts organoleptiques mesurés auraient pu être identifiées parmi d'autres espèces d'*Enterobacteriaceae* sous-dominantes. L'objectif était de séquencer à une profondeur de 15 millions de lectures par échantillon pour disposer de suffisamment de séquences par gène sur une échelle de $3\log_{10}$ entre les gènes les plus abondants et les moins abondants. Malheureusement, plus de 60 % des séquences obtenues correspondaient à des ARN de *Sus scrofa* (ARNr mitochondriaux et ARNm génomique). Trois raisons peuvent expliquer la

présence des ARNr mitochondriaux dans les échantillons : (1) ces ARN n'ont pas été détectés lors du contrôle qualité sur les puces Agilent 2100, ils ont été quantifiés au même titre que les ARNr procaryotes puisqu'ils sont également 16S, (2) avant le séquençage des ARN rétrotranscrits en cDNA, le kit Ribo-Zéro a été utilisé afin de se débarrasser des ARNr. Ce kit vise les ARNr bactériens et n'est pas spécifique aux ARNr mitochondriaux et (3) l'outil ribopicker a pour objectif de dépléter les ARNr bactériens séquencés résiduels en recherchant la similarité des séquences avec les séquences d'ARNr disponibles dans les bases de données. Cependant, ces bases ne contiennent que les séquences des gènes codant pour les ARNr 16S bactériens, donc l'outil Ribopicker n'a pas permis de dépléter ces ARNr. Enfin, la présence de l'ARNm génomique peut être expliquée par un manque d'efficacité du traitement à la DNAse réalisé par la plateforme de séquençage. Lors de la mise en place des expérimentations, il n'existait pas des travaux publiés d'analyses de RNAseq à partir d'ARN extrait *in situ* d'une matrice carnée, donc ce fait était inconnu. Depuis peu, la communauté scientifique s'est intéressée à cette approche et les auteurs intègrent la suppression des ARNr mitochondriaux dans leur pipeline d'analyse, mais une fois les ARN séquencés (Björkroth, 2016). Pour diminuer le fort pourcentage d'ARNr mitochondriaux et ainsi augmenter la quantité de séquences codantes bactériennes, en amont du séquençage, le kit de déplétion kit Ribo-Zero Gold rRNA Removal pourrait être utilisé puisqu'il a la spécificité de supprimer en une seule étape les ARNr mitochondriaux et les ARNr bactériens (Benes *et al*., 2011). La présence de ces ARNr dans nos échantillons a donc conduit à une diminution de la profondeur de séquençage des séquences bactériennes et n'a donc pas permis de disposer de suffisamment de séquences pour étudier les activités métaboliques des espèces plus faiblement exprimées.

Pour conclure, les études d'écologie microbienne des aliments visant à décrire le phénomène d'altération et les espèces microbiennes associées, ciblent principalement la population dominante, qui a longtemps été considérée comme la flore microbienne altérante.

Or, les travaux de cette étude soulignent le rôle primordial des espèces sous-dominantes dans les activités métaboliques de l'écosystème bactérien des chipolatas à 21 jours de conservation. De plus, la réduction de la teneur en sel influe sur les espèces sous-dominantes et cet effet a pu être démontré chez *Serratia* spp. Cependant nous ne disposions pas d'une profondeur de séquençage suffisante (due à la présence inattendue des ARNr de *Sus scrofa*) pour étudier les activités transcriptionnelles d'autres espèces sous-dominantes, telles que *Lelliottia amingena*, les *Enterobacter* spp. ou encore les *Citrobacter* spp. De plus, la réduction de la teneur en sel n'entraine pas le développement plus important d'une espèce ou d'une autre, mais la communauté bactérienne met en œuvre des voies métaboliques différentes. Cependant, le lien direct entre les activités transcriptionnelles identifiées et le développement de l'altération est délicat. En effet, ce phénomène est le résultat d'activités métaboliques complexes ayant lieu tout au long de la conservation. Pour caractériser au mieux la relation entre le développement de l'altération et la diversité et les activités métaboliques bactériennes, il serait intéressant de suivre l'ensemble de ces paramètres tout au long du stockage des produits et de mesurer également les métabolites et les composés volatils produits lors de l'altération des produits carnés (approche méta-métabolomique). Ce type d'approche est de plus en plus utilisé pour caractériser les activités des communautés bactériennes dans les aliments. C'est notamment le cas de Pogačić *et al*., (2015) qui ont étudié par cette approche, l'habilité des micro-organismes à produire les arômes des fromages. C'est également par cette approche que De Filippis *et al*., (2016) ont mis en évidence que les bactéries lactiques naturellement présentes dans les fromages jouaient un rôle prédominant dans l'affinage et dans le développement des arômes du fromage. Pour les produits carnés altérés, une étude de ce type, corrélant les activités métaboliques de la communauté bactérienne en lien avec les métabolites, n'a pas encore été menée. La mise en œuvre de ces approches nécessiterait donc d'élaborer des plans d'expériences plus complexes, mais permettrait de caractériser plus précisément les

implications des espèces microbiennes dans le développement de l'altération. Enfin, l'objectif de ces travaux était d'identifier l'effet des conditions expérimentales sur l'expression des gènes de l'écosystème bactérien. Les données de métatranscriptomique recueillies feront également l'objet d'une étude approfondie de l'expression des gènes dans leur globalité et des mécanismes de réponse d'adaptation de l'écosystème à la matrice carnée.

5.4. La réduction de la teneur en sel impacte faiblement la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata

La présence de *Salmonella* dans les aliments est la première cause de TIA en Europe en 2013 et la viande de porc et ses produits dérivés sont la troisième cause d'infections humaines à *Salmonella* derrière les viandes de volaille et les ovoproduits (EFSA, 2015). Le sel est le plus ancien conservateur utilisé pour limiter le développement des micro-organismes indésirables et notamment pour limiter le développement des bactéries pathogènes. En présence de 3 à 4 % de NaCl (m/m), la croissance de *Salmonella* est généralement ralentie ou inhibée (D'Aoust, 1989). Cependant les recommandations nutritionnelles visent à réduire les teneurs en sel dans les aliments et notamment dans les produits de charcuterie. Cette réduction de sel suggère un développement potentiel plus important de *Salmonella* ser. Typhimurium en cas de contamination accidentelle du produit. L'objectif des travaux présentés dans ce quatrième paragraphe était d'évaluer l'impact de la réduction de la teneur en sel dans les chipolatas, en combinaison avec le type de conditionnement, sur la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium et d'évaluer dans quelle mesure cette baisse de sel pourrait affecter l'expression des gènes de virulence du pathogène.

5.4.1. Stratégie expérimentale

Pour répondre à cet objectif, nous avons étudié la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans un environnement bactérien contrôlé afin de ne prendre en compte que l'effet des deux facteurs d'étude (sel et type de conditionnement) tout en s'affranchissant, dans un premier temps, d'une autre variable (présence de la flore naturelle). En effet, Møller *et al.*, (2013) ont montré que la présence de la flore naturelle dans de la viande de porc hachée à un taux initial de 10^6 UFC.g^{-1}, entraînait une survie de *Salmonella* voir un déclin de population, au cours du stockage à 9 °C pendant 10 jours. Une fois cette première étape

franchie, l'objectif était de passer à une situation plus complexe en chipolatas naturelles, où le pathogène serait en présence de la flore endogène du produit.

Après fabrication, la mêlée de chipolata a été décontaminée par irradiation à 8 kGy (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.1.1.2) afin de réduire la charge microbienne naturellement présente dans la viande.

Différents pré-tests de mesures continues de croissance en milieu de laboratoire BHI ont été réalisés, dans les conditions de sel et de pH similaires à celles de la mêlée de chipolata, et ont démontré qu'en dessous de 8 °C, aucune souche de *Salmonella* testée n'était capable de croître (résultats non présentés dans ce manuscrit). À partir de 8 °C, certaines souches, dont la souche *Salmonella* ser. Typhimurium choisie, souche sauvage isolée à partir de saucisses de porc maison (MH. Desmonts, communication personnelle), était capable de croître à 8 °C en présence de sel (1,5 et 2,0 %) dans le milieu BHI.

Les premiers tests de croissance réalisés en mêlée de chipolata préalablement décontaminée, à 1,5 % de NaCl, conservée à 8 °C sous atmosphère modifiée (50 % de CO_2 + 50 % de N_2) et sous vide pendant 21 jours ont révélé que *Salmonella* ser. Typhimurium ne croissait pas, elle survivait. Ces données vont à l'encontre de la prédiction de croissance, réalisée par Sym'Previus (Leporq *et al*., 2005), qui estimait la probabilité de croissance à 0,8 dans la mêlée de chipolata avec une teneur moyenne de 1,7 % de NaCl, un pH de 5,7, une a_w de 0,98 et conservée à 8 °C. Dans une optique de croissance dans nos conditions d'études, mais surtout pour obtenir un taux de population suffisant pour extraire les ARN et analyser les gènes exprimés après croissance du pathogène dans la mêlée, nous avons donc appliqué un scénario thermique de conservation à 8 °C avec une rupture de température à 20 °C pendant 18 h.

Ces pré-tests d'implantation ont également permis de définir le taux d'inoculation initiale de la souche dans la mêlée de chipolata. Trois taux d'inoculation ont été testés : 10^1 UFC.g^{-1}, 10^2 UFC.g^{-1} et 10^4 UFC.g^{-1}de mêlée de chipolata et en dessous de ce dernier taux, la souche n'était pas capable de pousser à 8 °C, elle survivait, voir déclinait. Nous avons donc fixé le taux d'inoculation du pathogène à 10^4 UFC.g^{-1}de mêlée de chipolata.

Dans ce contexte expérimental, nous avons donc suivi la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium, inoculée à 10^4 UFC.g^{-1} dans la mêlée de chipolata décontaminée, à deux teneurs en sel (1,5 % et 2,0 %), conservée sous atmosphère modifiée et sous vide, pendant 5 jours de conservation à 8 °C avec une rupture de température à 20 °C pendant 18 h dès le premier jour de conservation.

5.4.2. La croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium est affectée par le type de conditionnement et dans une moindre mesure par la teneur en sel

Salmonella ser. Typhimurium a été inoculée à 3,7 ± 0,4 $\log_{10}$ UFC.g^{-1}. À deux jours de conservation (à la sortie de la rupture de la chaîne du froid), *Salmonella* atteignait des taux de population, en moyenne, de l'ordre de 6,5 ± 0,7 $\log_{10}$ UFC.g^{-1} dans la mêlée de chipolata (Figure 29). Dans la mêlée conditionnée sous atmosphère modifiée, le taux de population atteint était plus faible que dans la mêlée conditionnée sous vide, une différence de 0,8 $\log_{10}$ UFC.g^{-1} a pu être observée. Cette différence de taux de population était toujours visible à 5 jours de conservation.

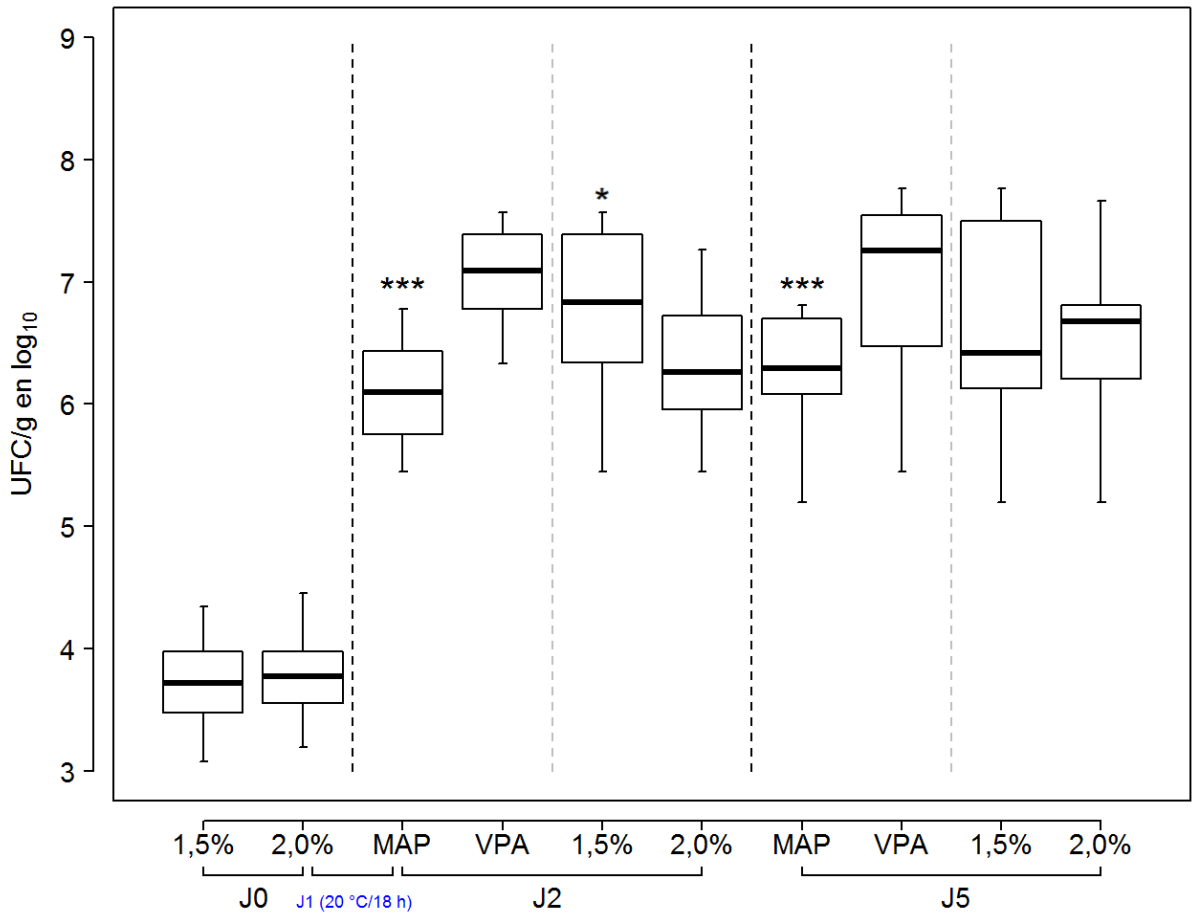


Figure 29 : dynamique de croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata préalablement décontaminée

Les box-plots présentent la concentration de *Salmonella* ser. Typhimurium (exprimée en $\log_{10}$ UFC.g-1 de mêlée de chipolata) durant 5 jours de conservation à 8 °C, selon la teneur en sel et le type de conditionnement (tous échantillons confondus, n = 18). La rupture de la chaîne du froid a eu lieu au premier jour de conservation et est indiquée en bleu. Sur chaque boîte sont représentés la médiane (ligne en gras) et les écarts interquartiles entre le premier et le troisième quartile. Les astérisques (***) indiquent une différence significative ($p < 0,001$, t-test bilatéral) entre le conditionnement sous vide (VPA) et le conditionnement sous atmosphère modifiée (MAP). Les astérisques (*) indiquent une différence significative ($p < 0,05$, t-test bilatéral) entre la teneur réduite en sel (1,5 %) et la teneur normale en sel (2,0 %).

Après deux jours de conservation, le taux de population de *Salmonella* ser. Typhimurium était significativement plus important dans les échantillons à teneur réduite en sel (1,5 %) que dans les échantillons à teneur normale (2,0 %, Figure 29). Cependant, cet effet n'était plus visible à 5 jours de conservation.

Ces travaux soulignent l'effet du type de conditionnement et de la teneur en sel sur la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium. La nature de l'atmosphère affecte le taux de population maximal atteint tandis que la teneur en sel influe sur la vitesse de croissance du pathogène. Ces conditions expérimentales qui affectent la croissance du pathogène, affectent certainement l'expression globale des gènes du pathogène et plus particulièrement l'expression des gènes de virulence qui pourraient influencer le pouvoir pathogène de la souche chez l'hôte.

5.4.3. Extraction des ARN de *Salmonella* ser. Typhimurium

Pour étudier l'expression des gènes de *Salmonella* ser. Typhimurium, nous avons extrait les ARN par la méthode décrite dans le paragraphe 4.3.2.2, après deux jours de conservation, à la fin de la rupture de la chaîne du froid à 20 °C. Les contrôles de qualité effectués ont révélé que l'ensemble des ARN était dégradé ; les RIN étaient compris entre 4,9 et 2,1 (Figure 30A). Un test d'extraction, utilisant cette méthode, a été réalisé à partir d'une culture pure de *Salmonella* en milieu liquide (~10^9 UFC.mL^{-1}) et les ARN extraits étaient de très bonne qualité (Figure 30B).

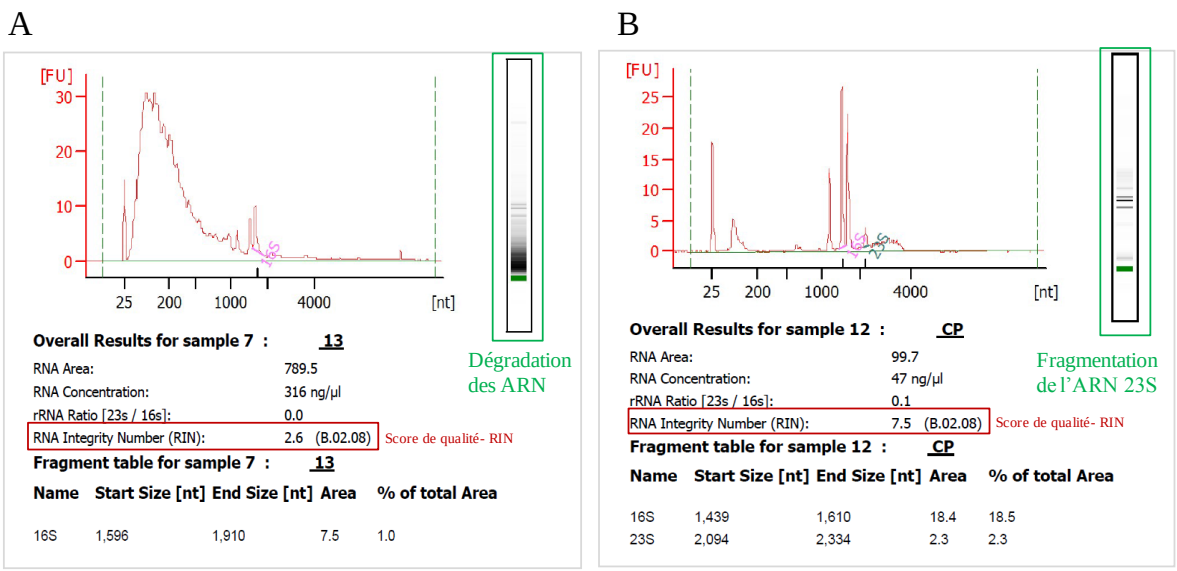


Figure 30 : comparaison de la qualité des ARN extraits à partir de la mêlée de chipolata (A) et à partir de culture pure (B)

La Figure 30 présente la comparaison de deux électrophorégrammes obtenus pour le contrôle qualité d'ARN bactériens extraits à partir de la mêlée de chipolata, 10^6 UFC.g^{-1} (A) et extraits à partir de culture pure à 10^9 UFC.mL^{-1} (B). Chaque électrophorégramme représente la mesure de l'intensité de la fluorescence des ARNr 16S et 23S et l'intégrité de ces ARN est indiquée par le score RIN (cadre rouge). Sur l'électrophorégramme (A) présenté à gauche, le score de qualité est très faible (2,6) ce qui indique que les ARN sont très dégradés. Cette dégradation est également visible par le profil de migration des ARN (cadre vert). Sur l'électrophorégramme (B) présenté à droite, les pics d'intensité spécifique aux ARNr 16S et 23S sont clairement visibles. Par le profil de migration sur gel (cadre vert) on identifie quatre bandes nettes. La première bande correspond à l'ARNr 16S et les trois autres bandes correspondent à l'ARNr 23S. Cette fragmentation du gène 23S chez *Salmonella*, qui s'effectue de manière innée, est connue et bien identifiée dans la littérature, cependant cette fragmentation et n'empêchera pas d'obtenir des ARNm de bonne qualité. Ceci explique le score de qualité de 7,5 avec cependant des ARN extraits de bonne qualité.

La méthode au trizol semble donc applicable à l'extraction des ARN de *Salmonella* ser. Typhimurium. De nouvelles extractions ont été réalisées en utilisant un kit d'extraction d'ARN (Direct-Zol RNA mini-prep R2050, Proteigene), mais la qualité des ARN extraits n'était pas meilleure. Un troisième test d'extraction a été réalisé en utilisant des protecteurs d'ARN, le RNAlater[a], utilisé lors de l'extraction du culot bactérien en remplacement de l'eau

[a] 1 % de phénol acide (Aquaph01, MPBio), 19 % d'éthanol absolu (20821.296, VWR) et 0,1 % de SDS 10 % (8.22050.1000, VWR), selon les recommandations de Eriksson *et al.*, 2003)

stérile et du tween 80 (cf. matériels et méthodes, paragraphe 4.3.1) et le RNAprotect (Qiagen, 76506), utilisé pour conserver les culots bactériens à - 80 °C. L'extraction a également été réalisée à partir d'une culture pure de *Salmonella* en milieu liquide, à une concentration souhaitée de 10^6 UFC.mL^{-1}. L'utilisation de ces deux agents protectants n'a pas permis d'améliorer la qualité des ARN de *Salmonella* ser. Typhimurium après croissance dans la mêlée de chipolata. De plus, à partir de la culture pure à 10^6 UFC.mL^{-1}, après extraction, nous n'avons pas réussi à obtenir les ARN du pathogène. La difficulté à l'extraction des ARN de *Salmonella* semble être une question de quantité de cellules bactériennes. De plus, avec le scénario de température appliqué, le taux de population de *Salmonella* ser. Typhimurium n'a pas atteint le taux cible de 10^9 UFC.g^{-1} après croissance dans la viande. Cette extraction aurait pu confirmer ou non l'hypothèse du taux de cellules bactériennes trop faible.

5.4.4. Discussion

L'objectif des travaux présentés dans ce troisième paragraphe était d'évaluer l'influence de la réduction teneur en sel dans la mêlée de chipolata sur la croissance et la physiologie de *Salmonella* ser. Typhimurium en combinaison avec le type de conditionnement.

Les travaux ont montré que l'utilisation du CO_2 dans l'atmosphère de conditionnement permettait de diminuer la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium dans la mêlée de chipolata par rapport à l'atmosphère sous vide. Ce résultat était attendu puisque l'action bactériostatique du CO_2 vis-à-vis des *Enterobacteriaceae* est bien connue (Dixon et Kell, 1989 ; Rodriguez *et al*., 2014). Les résultats de croissance observés sont en accord avec les résultats de (Nychas et Tassou, 1996) qui ont mis en évidence un taux de population plus faible (0,8 $\log_{10}$ UFC.g^{-1} de différence) de *Salmonella enteritidis* dans de la viande de poulet conditionnée sous atmosphère modifiée avec 20 % de CO_2 que dans la viande conditionnée

sous vide. Cependant, bien que sa croissance soit plus faible, *Salmonella* ser. Typhimurium conserve ses capacités à croître dans la viande en présence de CO_2.

Dans la mêlée de chipolata, la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium est moins affectée par la teneur en sel que par le type de conditionnement. La réduction de 25 % de sel dans les chipolatas favorise un développement plus rapide de *Salmonella* ser. Typhimurium, mais le taux de population maximum atteint est le même selon la teneur en sel. Cette réduction est donc possible dans les chipolatas sans craindre un développement plus important de *Salmonella* ser. Typhimurium et d'autant plus avec une température de conservation inférieure à 8 °C.

La connaissance de l'état physiologique de *Salmonella* ser. Typhimurium et plus largement des pathogènes impliqués dans les TIA et de leurs réponses génomiques et transcriptomiques mises en œuvre lors de stress environnementaux (tels que le sel ou encore l'atmosphère de conditionnement) est primordial pour développer des stratégies d'inhibition de croissance ciblées. Cette connaissance passe avant tout par l'analyse transcriptionnelle du pathogène dans le milieu environnemental d'étude. À ce jour, nous sommes face à un problème technique d'extraction des ARN de *Salmonella* ser. Typhimurium, à partir de la mêlée de chipolata, puisque les différentes méthodes utilisées ne nous ont pas permis d'extraire les ARN. L'hypothèse que nous avons émise quant à cette difficulté est la quantité de cellules bactériennes présentes.

Autant les extractions des ARN de *Salmonella* à partir de milieux environnementaux divers tels que les tissus intestinaux (Zhang *et al*., 2014) ou encore les cellules épithéliales (Hautefort *et al*., 2008) sont bien décrites dans la littérature, autant l'extraction des ARN à partir de produits alimentaires est peu connue. À ce jour, seules deux études proposent une méthodologie pour extraire les ARN de *Salmonella* à partir de matrice carnée : viande de

poulet (Sirsat *et al*., 2011) et viande hachée de bœuf (Kjeldgaard *et al*., 2011). Dans l'étude de Sirsat *et al*., (2011), la culture de *Salmonella* ser. Typhimurium a été inoculée à la surface de la viande de poulet (à 5, 6, 7 et 8 $\log_{10}$ UFC.g^{-1}) et laissée en contact pendant 30 min à température ambiante puis les ARN ont été extraits en utilisant également du RNAlater et du RNAprotect et en poursuivant l'extraction avec un kit d'extraction. Kjeldgaard *et al*., (2011) proposent un protocole similaire, un mélange de souches de *Salmonella* (*Salmonella* ser. Typhimurium et *Salmonella* ser. Derby) a été inoculé à un taux de 10^8 UFC.g^{-1} de viande hachée puis laissé en contact 10 min à température ambiante et les ARN ont également été extraits avec un kit d'extraction avec utilisation préalable de RNAlater. Cependant, les contextes expérimentaux de ces deux protocoles d'extraction diffèrent du nôtre. L'objectif de notre étude était d'évaluer l'influence de nos paramètres environnementaux sur la physiologie du pathogène après croissance dans la mêlée de chipolata et non après simple contact avec la mêlée. Cependant les résultats de Sirsat *et al*., (2011) confirment notre hypothèse de quantité de cellules bactériennes insuffisante pour extraire les ARN. En effet, ils ont pu mettre en évidence que la quantité de cellules minimales pour obtenir des ARN de bonne qualité et en quantité suffisante était de 8 $\log_{10}$ UFC.g^{-1}. Les taux inférieurs en cellules bactériennes, 7, 6 et 5 $\log_{10}$ UFC.g^{-1}, présentaient de plus faibles taux d'ARN et de qualité moindre. En faible quantité de cellules bactériennes, il n'y a pas suffisamment d'ARN pour être précipités. Dans les conditions expérimentales que nous avons appliqués (e.g. température de conservation, temps de stockage), nous ne sommes pas parvenus à obtenir un taux bactérien d'au moins 10^8 UFC.g^{-1}, après croissance dans la viande, pour disposer d'une quantité suffisante d'ARN. De plus, par rapport aux études de Sirsat *et al*., (2011) et Kjeldgaard *et al*., (2011) qui extraient les ARN de *Salmonella* à partir de produits carnés non transformés, la mêlée de chipolata est un produit transformé contenant de la viande, de la matière grasse et des épices. La dégradation des ARN peut être liée à la complexité de la mêlée et notamment à la présence

de RNAses, mais à notre connaissance, il n'existe pas actuellement de méthode permettant de le vérifier.

Pour conclure, nous avons mis en évidence l'effet des conditions expérimentales testées (type de conditionnement et teneur en sel) sur la croissance de *Salmonella* ser. Typhimurium. Si la méthodologie d'extraction des ARN est mise au point pour analyser les réponses physiologiques et transcriptomiques de *Salmonella*, ces expérimentations ne suffiront pas à l'analyse précise du comportement du pathogène. Il sera nécessaire de passer à un environnement plus complexe, en présence de la flore endogène des chipolatas.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

6. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'écosystème bactérien peut se définir comme l'association entre la communauté bactérienne (biocénose) avec l'environnement dans lequel elle se trouve (biotope). La biocénose regroupe les différentes espèces bactériennes et peut être caractérisée par quatre critères : (1) la **diversité** qui représente le nombre d'espèces bactériennes différentes, (2) la **population** qui définit le nombre d'individus par espèce, (3) la **croissance** qui caractérise l'évolution des espèces bactériennes au cours du temps et (4) les **activités métaboliques** des espèces qui traduisent l'utilisation des substrats disponibles dans le biotope. Ce biotope est caractérisé par deux composantes : le **substrat** (par exemple la viande) et **les conditions environnantes** (présence de sel, la température, l'environnement gazeux, etc.). L'écosystème est donc caractérisé par les interactions permanentes entre la biocénose et le biotope. Toute modification d'une des composantes du biotope peut entrainer des changements au sein de la communauté bactérienne.

Le sel est un ingrédient essentiel pour la conservation des produits de charcuterie, en particulier pour son action sur les communautés microbiennes. La baisse de sel va donc engendrer une modification de l'environnement dont les conséquences peuvent être bénéfiques ou néfastes pour la communauté bactérienne, sa dynamique et ses activités. Cette perturbation risque de plus de compromettre la qualité organoleptique des produits. Nous nous sommes donc interrogés sur les impacts de sa réduction sur la conservation des chipolatas.

Dans ce contexte, les objectifs de ce projet de thèse étaient de caractériser la communauté bactérienne des chipolatas et le phénomène d'altération sous l'effet de la réduction de sel et de corréler la dégradation organoleptique des produits aux modifications de la communauté bactérienne.

Pour établir les interactions entre la communauté bactérienne et les chipolatas dont la teneur en sel est réduite, nous avons abordé cette problématique par trois niveaux d'analyse : analyses sensorielles, analyse de diversité et analyse fonctionnelle. De plus, nous avons évalué si les effets de la réduction de sel étaient les mêmes selon le type de conditionnement utilisé et nous avons travaillé à température de conservation constante.

La baisse de sel impacte très faiblement la diversité bactérienne

Nous avons utilisé l'approche métagénétique pour caractériser la diversité de la communauté bactérienne des chipolatas afin d'avoir une vision globale de l'effet de la réduction de sel sur la communauté bactérienne et non sur une ou plusieurs espèces bactériennes ciblées. C'est d'ailleurs principalement par l'approche culturale ciblée que beaucoup d'études ont été menées pour évaluer les effets de la baisse de sel (revue de Taormina, 2010). Par l'approche globale, nous avons pu dresser un inventaire des espèces bactériennes présentes dans les chipolatas en fin de conservation, qui n'avait pas été établi jusque là. Les bactéries à Gram positif et particulièrement les Firmicutes sont souvent reportées comme bactéries altérantes des produits carnés (Chaillou *et al*., 2015 ; Remenant *et al*., 2015). Pour pallier la variabilité microbiologique de la matière première, nous avons caractérisé la diversité bactérienne à partir de 5 lots différents de chipolatas. À partir des 20 échantillons (5 lots × 4 conditions), nous avons identifié 78 OTU différents, mais seulement 18 OTU constituent le cœur bactérien des chipolatas, plus précisément, ces 18 OTU sont retrouvés dans les 20 échantillons. Parmi ce cœur bactérien, les bactéries lactiques constituent le groupe bactérien majoritaire. Les espèces du genre *Lactobacillus* (*L. sakei* et *L. curvatus*), présentes dans les chipolatas, sont fréquemment identifiées dans les produits altérés conservés sous atmosphère modifiée ou sous vide (Casaburi *et al*., 2015). Nous avons également mis en évidence la présence de *L. oligofermentans*. Cette espèce a été décrite en 2005 (Koort *et al*., 2005) comme étant une espèce majoritaire impliquée dans l'altération de

viande de poulet conservée sous atmosphère modifiée. L'étude que nous avons réalisée permet de montrer que cette espèce est également présente dans les produits carnés à base de porc. Parmi les autres bactéries lactiques, les espèces du genre *Carnobacterium* (*C. divergens* et *C. maltaromaticum*) sont également fréquemment identifiées comme bactéries majoritaires dans les produits carnés (Leisner *et al*., 2007 ; Ercolini *et al*., 2009). Nous avons également identifié des espèces des genres *Lactococcus* (*L. piscium*), *Leuconostoc* (*L. carnosum* et *L. citreum*), *Enterococcus* (*E. avium* et *E. durans*) et *Vagococcus* (*V. fluvialis*). La présence de *B. thermosphacta* dans les chipolatas n'est pas surprenante puisqu'il s'agit d'une bactérie psychrophile connue comme étant altérante dans les produits carnés (Losantos *et al*., 2000 ; Nychas *et al*., 2008 ; Doulgeraki *et al*., 2011). Les entérobactéries sont le deuxième groupe bactérien identifié dans les chipolatas. Ce groupe d'espèces bactériennes est prédominant dans la viande de poulet conservée sous atmosphère modifiée (Säde *et al*., 2013), mais ces espèces sont également retrouvées dans la viande de bœuf et de porc (Jay *et al*., 2003). Parmi ce groupe, nous avons identifié la présence d'espèces de *S. proteamaculans*, *C. youngae*, *E. kobei*, *L. amnigena* (anciennement *E. amnigenus*) *Y. kristensenii* et *G. quercinecans*.

Ces 18 espèces précédemment citées sont retrouvées dans les deux conditions de sel, teneur normale (2,0 %) et teneur réduite (1,5 %) en sel. Ainsi, la réduction de la teneur en sel n'impacte pas la diversité bactérienne des chipolatas après 21 jours de conservation. À ce jour, une seule étude pointe l'effet de la réduction de la teneur en sel sur la diversité d'un écosystème alimentaire. Miller *et al*., (2015) ont identifié par la méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 12 espèces bactériennes dans des plats prêts-à-consommer à base de viande à teneur réduite en sel (1,5 ± 0,2 % m/m) contre 6 dans leurs homologues à teneur standard en sel (2,5 ± 0,3 % m/m). Les auteurs ont associé cette différence de diversité à la concentration de sel qui inhiberait le développement de certaines bactéries. La méthode DGGE utilisée dans cette étude est une méthode non-culturale de séparation et d'isolation des

séquences d'ADN sur la base de leurs caractéristiques de dénaturation. Pour identifier une espèce bactérienne selon son profil de migration, il est nécessaire de disposer d'une référence de migration pour chaque espèce bactérienne. Par ailleurs, cette méthode DGGE est clairement moins sensible que la méthode de métagénétique pour décrire la diversité bactérienne. De plus, il s'agit de divers produits cuits (jambon, poitrine de poulet, etc.) pour lesquels la présence des espèces bactériennes résulte d'une contamination post-cuisson alors que dans notre étude, nous avons suivi la communauté naturelle des chipolatas (produits crus).

L'approche que nous avons utilisée nous a donc permis d'accéder à la description précise de la communauté conservée dans l'ensemble des chipolatas et nous avons mis en évidence que la réduction de sel n'impactait pas la diversité de la communauté bactérienne.

La baisse de sel impacte l'abondance des espèces sous-dominantes

L'abondance de la population est le deuxième critère qui caractérise une communauté bactérienne. La technique de pyroséquençage que nous avons utilisée, combinée à de la qPCR pour quantifier l'abondance des espèces bactériennes, nous a permis de discriminer deux populations selon leur abondance : une population dominante et une population sous-dominante. La population dominante est composée de *L. sakei*, *L. piscium*, *C. divergens* et *C. maltaromaticum*. Nous avons décrit et étudié la communauté bactérienne à partir de 20 échantillons issus de 5 lots de fabrication de chipolatas indépendants. L'espèce dominante de chacun des échantillons était différente selon les lots, mais dans 45 % des cas, *L. sakei* était l'espèce majoritaire. Cette fluctuation de l'espèce dominante souligne la variabilité microbiologique de la matière première et conforte la nécessité de disposer d'un large panel d'échantillons pour analyser la diversité bactérienne d'un écosystème alimentaire.

L'abondance des quatre espèces dominantes des chipolatas n'est pas affectée par la réduction de la teneur en sel. *L. sakei* est reconnue comme étant une espèce bactérienne

halotolérante. Cette espèce est l'une des bactéries la plus fréquemment utilisée comme culture starter pour la fermentation de saucisson dont la teneur en sel est de 3,5 % (Ammor *et al*., 2005). Cette espèce est particulièrement performante en raison de ses capacités de croissance à basse température (~ 4 °C) et de résistance au sel. Certaines souches sont capables de croître jusqu'à 6,5 % de NaCl (Ammor *et al*., 2005) tandis que d'autres ont la capacité de pouvoir se développer jusqu'à 9 % de NaCl, reflet de la concentration en sel en fin de maturation des saucissons secs (Marceau *et al*., 2003). Cette tolérance au sel a été attribuée à la capacité de la souche à accumuler des solutés tels que la bétaïne et la carnitine qui sont des osmoprotectants (Chaillou *et al*., 2005). Par ailleurs, la viande n'est pas l'unique écosystème alimentaire où *L. sakei* peut être trouvée. Cette espèce a été isolée dans des anchois et du poulpe salés (Najjari *et al*., 2008) ou encore du kimchi (Kim et Chun, 2005).

À ce jour, les capacités halotolérantes de *L. piscium* ne sont pas démontrées. Cette espèce a été identifiée dans de nombreux écosystèmes alimentaires tels que des filets de saumon (Macé *et al*., 2012), de la viande de bœuf (Sakala *et al*., 2002) et du Montasio en début d'affinage, fromage AOP italien (Carraro *et al*., 2011). Les deux produits carnés et de la mer cités ont subi très peu d'étapes de transformation, hormis la découpe et le conditionnement, le sel n'est pas un ingrédient utilisé dans ces produits. Concernant le fromage, nous n'avons pas trouvé, ni dans l'étude citée ni dans diverses instructions de préparation, la teneur en sel dans le produit. Cependant, Leroi *et al*., (2012) ont récemment déterminé les paramètres de croissance (μ_{max}) de *L. piscium* en milieu liquide de laboratoire et ils ont démontré que le NaCl n'était pas nécessaire à sa croissance, mais que celle-ci était stoppée dès 23 $g.L^{-1}$ (m/v) de NaCl, soit l'équivalent de 2,3 % (m/m) de NaCl dans le milieu. La présence de *L. piscium* dans les chipolatas est en lien avec ses capacités de croissance dans la gamme de sel étudiée. Les espèces du genre *Carnobacterium* sont présentes et dominantes dans de nombreux écosystèmes alimentaires et leur capacité halotolérante est reconnue. Les espèces de

Carnobacterium sont en mesure de croître dans entre 0 et 6 % (m/v) de NaCl (Ringo *et al*., 2002), voir 10 % pour *C. divergens* (Kim et Austin, 2008). Nous avons étudié l'effet d'une réduction de 25 % de sel et nous n'avons pas travaillé dans des conditions présence/absence de sel. Pour des espèces halotolérantes, il est clairement évident que cette variation mineure de concentration en sel n'impacte pas leur abondance.

La population sous-dominante (en abondance) est composée de *B. thermosphacta* et d'espèces d'entérobactéries dont *S. proteamaculans*. L'abondance de ces espèces sous-dominantes est impactée par la réduction de la teneur en sel. Nos travaux sont les premiers à mettre en évidence les impacts de la réduction de sel sur une population sous-dominante. En effet, par la méthode de caractérisation utilisée, nous avons pu accéder à la description de cette population sous-dominante. Les études décrites dans la littérature ont principalement été menées par méthodes culturales pour démontré les effets de la réduction de la teneur en sel (revue de Taormina, 2012). En plus du biais de culture de ces méthodes qui limite la croissance de nombreuses espèces bactériennes, cette approche ne permet néanmoins d'étudier que les espèces dominantes. Cependant, l'impact du sel démontré dans notre étude est tout à fait inattendu, l'abondance des deux espèces citées (*B. thermosphacta* et *S. proteamaculans*) est plus faible quand la teneur en sel est réduite. Ces résultats vont à l'encontre de ce qui pouvait être attendu par rapport aux propriétés bactériostatiques du sel et suggèrent ainsi que le sel favorise la croissance de *B. thermosphacta* et *S. proteamaculans* dans les chipolatas. En milieu de culture, *B. thermosphacta* est capable de croître jusqu'à 6,2 % (m/v) de NaCl (Leroi *et al*., 2012) tandis que certains souches ont les capacités de survivre jusqu'à 9 % de NaCl [m/v (Masana et Baranyi, 2000)]. *B. thermosphacta* est d'ailleurs plus résistant au sel que d'autres bactéries lactiques telles que *L. piscium* qui ne tolère que 2,3 % (m/v). Les capacités halotolérantes de *S. proteamaculans* sont peu décrites. Cependant, des

espèces du genre *Serratia* spp. ont été identifiées dans du fromage AOP « Pecorino Siciliano » contenant 3 % (m/m) de NaCl (Todaro *et al*., 2011).

Par cette méthode moléculaire, nous avons pu discriminer la population dominante de la population sous-dominante et nous avons pu montrer que la réduction de la teneur en sel modifiait l'abondance des espèces sous-dominantes.

La baisse de sel impacte le profil transcriptionnel d'une seule espèce sous-dominante

Les activités métaboliques sont le troisième critère qui caractérise une communauté bactérienne et dans cette étude nous avons analysé les activités transcriptionnelles pour accéder aux fonctions métaboliques portées par la communauté bactérienne. Parmi toutes les espèces que nous avons identifiées dans les chipolatas, seules deux d'entre elles sont actives après 21 jours de conservation : *L. sakei* (espèce dominante) et *Serratia* spp. (espèce sous-dominante). Les autres espèces bactériennes sont très faiblement actives ; par rapport aux taux de population mesurés, les activités transcriptionnelles mesurées sont très faibles. Prenons le cas des espèces de *Carnobacterium* ou encore de *B. thermosphacta*. Après 21 jours de conservation, ces espèces sont présentes en moyenne à 5,8 et 4,3 $\log_{10}$UFC.g^{-1} respectivement, et peuvent atteindre plus de 6 $\log_{10}$UFC.g^{-1} selon les échantillons. Cependant, les méthodes culturales réalisées à T_0 pour dénombrer la flore totale cultivable indiquaient que le taux de population maximal atteint était de $4{,}2 \pm 0{,}5$ $\log_{10}$ UFC.g^{-1}. Ces données suggèrent donc que ces deux espèces ont été actives durant la conservation des chipolatas. Ainsi, nous pouvons supposer que les chipolatas sont un écosystème alimentaire dynamique où a eu lieu une succession d'espèces et d'activités bactérienne. Benson *et al.*, (2014) ont effectivement montré qu'il y avait une évolution successive des différentes espèces bactériennes durant les 80 jours de conservation de saucisses. Ce type de dynamique a également été démontré dans

d'autres écosystèmes alimentaires : lors de la fermentation du kimchi (Park *et al*., 2012) ou encore lors de l'affinage de fromages (Dugat-Bony *et al*., 2015).

Pour établir un lien entre les fonctions métaboliques des deux espèces bactériennes actives et le phénomène d'altération lorsque la teneur en sel est réduite, nous avons identifié puis analysé les gènes qui étaient différentiellement exprimés selon les deux conditions de sel. Ainsi, pour les deux espèces, la baisse de sel entraîne une sous-expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (chez *L. sakei* et *Serratia* spp.) et des acides aminés (chez *Serratia* spp.). Dans cette condition de sel, les besoins en acides gras et en acides aminés sont moins importants. Par ailleurs, la réduction de sel impacte le métabolisme central de *Serratia* spp : la fermentation du glucose est d'autant plus importante que la teneur en sel est réduite dans les chipolatas. Ces données reflètent donc qu'en termes fonctionnels, *Serratia* spp. semble être dans de meilleures conditions quand il y a moins de sel.

Le profil métabolique de *Serratia* spp. impacte l'aspect et l'odeur des chipolatas

La fermentation de glucose est un processus métabolique qui convertit le glucose en pyruvate. En condition anaérobie, ce métabolite est ensuite convertit en éthanol, CO_2 et acétate. Les analyses transcriptionnelles ont permis d'identifier que cette voie de fermentation était plus exprimée chez *Serratia* spp. dans les chipolatas à teneur réduite en sel. Selon les informations disponibles dans la littérature, dans les produits carnés altérés les principaux producteurs d'acétate sont les bactéries lactiques telles que *L. gasicomitatum* (Jääskelainen *et al*., 2013), *L. sakei*, *L. curvatus* (Hernández-Macedo *et al*., 2012) ou les espèces de *Carnobacterium* (Nychas *et al*., 2008). Nos travaux montrent donc que *Serratia* spp. est un acteur important dans la production d'acétate dans les produits carnés altérés. Ce métabolite a trois caractéristiques principales. Il s'agit dans un premier temps d'un acide (acide acétique) qui fait donc baisser le pH de l'environnement dans lequel il se trouve en raison de la

libération d'un atome d'hydrogène (H) du groupe carboxyle (–COOH). Cette baisse de pH est l'un des défauts d'altération mesurés dans les chipolatas. La conséquence de cette diminution de pH est la diminution du point isoélectrique des protéines myofibrillaires de la viande réduisant ainsi leur pouvoir de rétention d'eau et augmentant la libération d'eau dans le milieu extérieur. Cette libération d'eau est le deuxième défaut d'altération que nous avons mesuré, dans les chipolatas à teneur réduite en sel, nous avons relevé une production plus importante d'exsudat. Deuxièmement, l'acide acétique est la molécule responsable des odeurs aigres dans les produits carnés altérés et ces odeurs sont également un défaut d'altération mesuré dans les chipolatas. Enfin, l'acétate est connu et utilisé comme inhibiteur de croissance bactérienne. Lors de la production d'acétate, les protons s'accumulent dans le milieu faisant diminuer le pH cytoplasmique et cette acidification du milieu interne perturbe la majorité des processus physiologiques des cellules bactériennes (Beales, 2004 ; Mills *et al*., 2009). L'abondance mesurée de *Serratia* dans les chipolatas corrobore la production d'acétate, le nombre d'individus est plus faible quand la teneur en sel est plus faible. Ainsi, d'après nos travaux, nous pouvons supposer que les espèces de *Serratia* s'auto-inhibent en produisant de l'acétate dont elles semblent très sensibles. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude qui démontrent la sensibilité de *Serratia* spp. face à cet acide organique. Cependant, *S. marcescens* est capable de résister à des environnements très acides, puisqu'il transite à travers le tractus gastro-intestinal pour coloniser l'intestin de l'hôte (Ochieng *et al*., 2014).

Dans les produits de charcuterie, l'acétate est classiquement utilisé en tant qu'additif, mais il est couplé à divers sels tels que le sodium (acétate de sodium – E262) ou le potassium (acétate de potassium – E261) afin de conserver les propriétés inhibitrices de l'acétate sans en voir avoir les inconvénients tels que l'odeur aigre très prégnante. Récemment, Benson *et al*., (2014) ont d'ailleurs testé l'efficacité d'un mélange de lactate de sodium avec du diacétate de sodium vis-à-vis des flores aérobies mésophiles et psychrotrophes, des bactéries lactiques et

des *Enterobacteriaceae* dans des saucisses de porc. L'ajout de ce mélange permet de réduire significativement la croissance des quatre populations bactériennes suivies et les auteurs ont relié le retard d'apparition de l'altération des saucisses à l'utilisation de ces conservateurs. De plus, Tangkam *et al*., (2012) ont démontré que l'acétate de sodium était l'additif le plus efficace pour réduire de plus de 1,5 $\log_{10}$UFC.g^{-1}, la croissance de la flore bactérienne aérobie de poitrine de poulet crue après 14 jours de stockage à 3 °C.

Au vu de la sensibilité de *Serratia* vis-à-vis de l'acétate, un moyen de lutte biologique de son développement dans les chipolatas serait d'identifier et d'utiliser une espèce bactérienne en tant qu'agent bio-préservant qui aurait la capacité de produire de l'acétate pour inhiber le développement cette espèce au potentiel altérant.

Les interactions que nous n'avons pas pu identifier

Parmi les autres défauts d'altération des chipolatas que nous avons mesurées par méthodes sensorielles, l'odeur rance n'a pas pu être corrélée à une activité transcriptionnelle particulière. Ce type d'odeur est principalement associé à des aldéhydes et notamment de l'acétoïne et du 2,3-butanediol. Lors de la fermentation du pyruvate, celui-ci est transformé en acétolactate par une acétolactate décarboxylase qui est ensuite converti en acétoïne par une acétolactate synthase puis, en présence de $NADH+H^+$, l'acétolactate synthase va réduire l'acétoïne en 2,3-butanediol. Rao *et al*., (2012) ont montré que *Serratia marcescens* était capable de convertir le pyruvate par cette voie catabolique. À 21 jours de conservation, ces gènes n'étaient pas exprimés, ce n'est donc pas *Serratia* qui est responsable des odeurs rances dans les chipolatas. Dans la revue bibliographique que nous avons présentée dans le deuxième chapitre, nous avons souligné que les espèces de *Carnobacterium* (Casaburi *et al*., 2011 ; La Storia *et al*., 2012) et de *B. thermosphacta* (Dainty et Hibbard, 1983 ; Casaburi *et al*., 2015) étaient impliquées dans la production d'odeurs rances. Or, à 21 jours de conservation, ces espèces sont très faiblement actives. Les activités métaboliques de ces espèces ont

probablement eu lieu avant les mesures réalisées à 21 jours. De même, les odeurs soufrées sont principalement liées à la dégradation des protéines de la viande par des bactéries protéolytiques qui conduisent à la libération de dérivés soufrés. Les espèces de *Pseudomonas* sont particulièrement responsables de ce phénomène (Ercolini *et al*., 2010). Or, dans les chipolatas altérées après 21 jours de conservation, nous n'avons pas identifié d'espèces de *Pseudomonas*. Pour identifier les espèces impliquées dans ces deux défauts d'odeurs, il aurait fallu mesurer les activités transcriptionnelles de la communauté bactérienne de manière dynamique tout au long de la conservation des produits. Par ailleurs, pour établir les relations entre les défauts d'altération et la communauté bactérienne, il était initialement prévu de décrire l'altération dès qu'un défaut d'altération apparaissait dans une des quatre conditions d'étude. Or, il est difficile d'identifier clairement un point de rupture entre les échantillons non altérés et les échantillons altérés, puisque l'altération est caractérisée par l'évolution du produit dans le temps et non le changement d'état brutal de celui-ci. Nous avons donc choisi de caractériser l'altération et la diversité bactérienne en fin de vie des produits, à 21 jours de conservation sans faire de point intermédiaire, au risque, comme nous l'avons identifié, de manquer des corrélations entre les défauts d'altération et les fonctions métaboliques de la communauté bactérienne. Enfin, la décoloration des produits n'a pas été reliée à une activité transcriptionnelle particulière. Cependant cette décoloration n'était pas inhérente à la réduction de la teneur en sel.

Résumé de la boucle d'interactions et perspectives

Les objectifs de ces travaux étaient de caractériser la communauté bactérienne des chipolatas et le phénomène d'altération sous l'effet de la réduction de sel et de corréler la dégradation organoleptique des produits aux modifications de la communauté bactérienne. Ces travaux démontrent clairement que l'environnement (le sel) impacte fortement les différents niveaux de la communauté bactérienne des chipolatas (abondance et fonctions

métaboliques) et que ces modifications compromettent la qualité organoleptique des produits. Parmi les différents niveaux d'analyses réalisés, ce sont principalement les analyses transcriptionnelles qui nous ont permis d'identifier les interactions de la communauté bactérienne sur la matrice et de démontrer que l'espèce *Serratia* spp. était fortement impliquée dans l'altération des chipolatas. Pour confirmer nos observations, il faudrait envisager une approche combinée où la communauté bactérienne serait suivie tout au long de la conservation et le dosage des métabolites produits (acides aminés, sucres, acides gras, acides organiques, aldéhyde, etc.) serait effectué en parallèle de la croissance bactérienne afin d'établir des interactions plus fines entre les espèces bactériennes et l'altération des produits. La méta-métabolomique permet de caractériser simultanément et rapidement, des centaines de métabolites (cf. revue bibliographique, paragraphe 2.3.3.3). De ce fait, elle diffère substantiellement des méthodes traditionnelles de la biochimie qui ne détectent qu'un ou quelques métabolites (mesures ciblées). L'emploi de techniques d'analyses comme la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN) et de statistiques adaptées ont permis son développement. Cette approche devient pertinente quand il s'agit de caractériser les métabolites produits lors de l'altération des produits carnés.

Et pour conclure,

Dans cette étude, nous avons évalué les impacts de deux facteurs abiotiques sur la communauté bactérienne des chipolatas : le type d'atmosphère de conditionnement et la teneur en sel. Il est reconnu que les conditions anaérobies de conservation (sous atmosphère modifiée ou sous vide) exercent une pression sélective sur les communautés microbiennes. Les travaux de notre étude démontrent que le conditionnement sous atmosphère modifiée réduit significativement la richesse bactérienne des chipolatas, et que cette baisse de diversité est associée à une intensité d'altération plus importante que lorsque les chipolatas sont conditionnées sous vide. Cependant, malgré l'effet marquant du type d'atmosphère de

conditionnement sur l'altération et la diversité de la communauté bactérienne, nous n'avons pas pu établir de lien avec les activités transcriptionnelles de cette communauté. La faible variation de sel que nous avons étudié suggérait des effets mineurs puisqu'il ne s'agit pas d'une étude d'absence et présence de NaCl. Malgré cette petite variation de concentration en sel, c'est l'effet le plus prégnant que nous avons mis en évidence et notamment sur les activités transcriptionnelles de la communauté bactérienne.

Les recommandations nutritionnelles visent à réduire les teneurs en sel dans les produits de charcuterie, mais nos travaux démontrent que cette baisse de sel favorise l'altération des produits. Il y a donc nécessité à trouver des alternatives de conservation pour répondre aux exigences nutritionnelles tout en n'affectant pas la qualité organoleptique des produits. Nos travaux ont également démontré que malgré son effet bactériostatique, le conditionnement sous atmosphère modifiée ne permettait pas de réduire l'altération des chipolatas, bien au contraire. Depuis quelques années, l'utilisation de souches bio-protectrices, telles que *L. carnosum* ou *L. curvatus* pour ne citer que deux exemples, s'est révélée particulièrement efficace pour lutter contre le développement de bactéries indésirables et notamment pour ralentir le développement de bactéries altérantes dans des produits carnés (Metaxopoulos *et al.*, 2002 ; Vasilopoulos *et al.*, 2010). Cette nouvelle approche de conservation pourrait être envisagée pour contrebalancer les effets de la réduction de la teneur en sel dans les produits de charcuterie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ağaoğlu S., Nursel D., and Sueleyman A. 2007. “Antimicrobial Activity of Some Spices Used in the Meat Industry.” *Bull Vet Inst Pulawy* 51: 53–57.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. 2002. “Rapport Sel : Evaluation et Recommandations.”

Aldrete-Tapia A., Escobar-Ramírez M. C., Tamplin M.L., and Hernández-Iturriaga M. 2014. “High-Throughput Sequencing of Microbial Communities in Poro Cheese, an Artisanal Mexican Cheese.” *Food Microbiology* 44: 136–41. doi: 10.1016/j.fm.2014.05.022

Alegria A., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J., and Kowalczyk M. 2012. “Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches.” *Applied and Environmental Microbiology* 78 (6): 1890–98. doi : 10.1128/AEM.06081-11

Almeida M., Hébert A., Abraham A-L., Rasmussen S., Monnet C., Pons N., Delbès C., et al. 2014. “Construction of a Dairy Microbial Genome Catalog Opens New Perspectives for the Metagenomic Analysis of Dairy Fermented Products.” *BMC Genomics* 15 (1101): 1471–2164.

Álvarez-Ordóñez A., Fernández A., Bernardo A., and López M. 2009. “A comparative study of thermal and acid inactivation kinetics in fruit juices of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg grown at acidic conditions.”*Foodborne Pathogens and Disease* 6(9): 1147-1155.

Álvarez-Ordóñez A., Prieto M., Bernardo A., Hill C., and López M. 2012. “The Acid Tolerance Response of *Salmonella* Spp.: An Adaptive Strategy to Survive in Stressful Environments Prevailing in Foods and the Host.” *Food Research International* 45 (2): 482–92. doi : 10.1016/j.foodres.2011.04.002

Amann R. I., Wolfgang L., and Schleifer K-H. 1995. “Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation.” *Microbiological Reviews* 59 (1): 143–69.

Ambard L., Beaujard E. 1904. “Causes de l’hypertension arterielle. ” *Arch Gen Med*.;1:520-533

Ammor S., Dufour E., Zagorec M., Chaillou S., and Chevallier I. 2005. “Characterization and Selection of *Lactobacillus Sakei* Strains Isolated from Traditional Dry Sausage for Their Potential Use as Starter Cultures.” *Food Microbiology* 22 (6): 529–38. doi : 10.1016/j.fm.2004.11.016

Anbalagan, M., Ganesh Prabu P., Krishnaveni R.E., and Manivannan S. 2014. “Effect of Sodium Chloride (NaCl) on the Bacterial Load in Chicken, Mutton and Beef Meat Samples in Relation to Meat Spoilage.” *Internation Journal of Research in Zoology* 4 (1): 1–5.

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at:http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

B

Bailly J., Fraissinet-Tachet L., Verner M-C., Debaud J-C., Lemaire M., Wésolowski-Louvel M., and Marmeisse. R. 2007. “Soil Eukaryotic Functional Diversity, a

Metatranscriptomic Approach." *International Society for Microbial Ecology* 1: 632–42.

Baker G.C., Smith J-J., and Cowan D. A. 2003. "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers". *Journal of Microbiological Methods* 55 (3):541-555.

Barco L., Belluco S., Roccato A., and Ricci A. 2015. "A Systematic Review of Studies on *Escherichia Coli* and *Enterobacteriaceae* on Beef Carcasses at the Slaughterhouse." *International Journal of Food Microbiology* 207:30–39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.027.

Bayoumi M. A., and Griffiths M. W. 2012. "In Vitro Inhibition of Expression of Virulence Genes Responsible for Colonization and Systemic Spread of Enteric Pathogens Using *Bifidobacterium Bifidum* Secreted Molecules." *International Journal of Food Microbiology* 156 (3): 255–63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.034.

Beales N. 2004. "Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3.

Begon M., Townsend C. R., and Harper J. L. 2006. "Ecology from Individuals to Ecosystems." fourth edition, Blackwell Publishing Ltd.

Benes V., Blake J., and Doyle K.. 2011. "Ribo-Zero Gold Kit: Improved RNA-Seq Results after Removal of Cytoplasmic and Mitochondrial Ribosomal RNA." *Nature Methods*.

Benson A. K., David J. R. D., Gilbreth S. E., Smith G., Nietfeldt J., Legge R., Kim J., et al. 2014. "Microbial Successions Are Associated with Changes in Chemical Profiles of a Model Refrigerated Fresh Pork Sausage during an 80-Day Shelf Life Study." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (17): 5178–94. doi: 10.1128/AEM.00774-14

Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., and Sayers E. W. 2013. "GenBank." *Nucleic Acids Research* 41: D36–D42.

Beresford M.R., Andrews P.W., and Shama G.. 2001. "*Listeria Monocytogenes* Adheres to Many Materials Found in Food-Processing Environments." *Journal of Applied Microbiology* 90: 1000–1005.

Björkroth J. 2005. "Microbiological Ecology of Marinated Meat Products." *Meat Science* 70 (3): 477–80. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.07.018

Björkroth J. 2016. "Microbial ecology from the perspective of food spoilage." FoodMicro 2016, Dublin, Irlande. Available online: http://www.foodmicro2016.com/wp-content/uploads/2016/07/16.15-johanna-Dublin_Bjorkroth.pdf

Blankenberg D., Gordon A., Von Kuster G., Coraor N., Taylor J., Nekrutenko A. et al. 2010. "Manipulation of Fastq data with Galaxy." *Bioinformatics* 26(14): 1783-1785

Blickstaf E., and Molin G. 1983. "Carbon Dioxide as a Controller of the Spoilage Flora of Pork, with Special Reference to Temperature and Sodium Chloride." *Journal of Food Protection*® 8 (9): 756–822.

Boers R.H., and Djikmann K.E. 1994. "Shelf-Life of Vacuum-Packaged Wild Boar Meat in Relation to that of Vacuum-Packaged Pork: Relevance of Intrinsic Factors." *Meat Science* 37: 91–102.

Bokulich N. A., and Mills D. A. 2012. "Differentiation of Mixed Lactic Acid Bacteria Communities in Beverage Fermentations Using Targeted Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism." *Food Microbiology* 31 (1): 126–32. doi: 10.1016/j.fm.2012.02.007.

Bombrun L., Gatellier P., Portanguen S., and Kondjoyan A. 2015. "Analysis of the Juice and Water Losses in Salted and Unsalted Pork Samples Heated in Water Bath. Consequences for the Prediction of Weight Loss by Transfer Models." *Meat Science* 99: 113–22. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.07.033.

Booijink C. C. G. M., Boekhorst J., Zoetendal E. G., Smidt H., Kleerebezem M., and de Vos W. M. 2010. "Metatranscriptome Analysis of the Human Fecal Microbiota Reveals Subject-Specific Expression Profiles, with Genes Encoding Proteins Involved in Carbohydrate Metabolism Being Dominantly Expressed." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (16): 5533–40. doi: 10.1128/AEM.00502-10.

Borch E., Kant-Muermans M-L., and Blixt Y. 1996. "Bacterial Spoilage of Meat and Cured Meat Product." *International Journal of Food Microbiology* 33: 103–20.

Bornert G. 2000. "Importance Des Bactéries Psychrotrophes En Hygiène Des Denrées Alimentaires." *Revue Méd. Vét* 151 (11): 1003–10.

Bowe F., Lipps C. J., Tsolis R. M., Groisman E., Heffron F., and Kusters J. G. 1998. "At Least Four Percent of the Salmonella Typhimurium Genome Is Required for Fatal Infection of Mice." *Infection and Immunity* 66 (7): 3372–77.

Brady C, Cleenwerck I., Venter S., Coutinho T., and De Vos P. 2013. "Taxonomic Evaluation of the Genus *Enterobacter* Based on Multilocus Sequence Analysis (MLSA): Proposal to Reclassify *E. Nimipressuralis* and *E. Amnigenus* into *Lelliottia* Gen. Nov. as *Lelliottia Nimipressuralis* Comb. Nov. and *Lelliottia Amnigena* Comb. Nov., Respectively, *E. Gergoviae* and *E. Pyrinus* into *Pluralibacter* Gen. Nov. as *Pluralibacter Gergoviae* Comb. Nov. and *Pluralibacter* Pyrinus Comb. Nov., Respectively, *E. Cowanii*, *E. Radicincitans*, *E. Oryzae* and *E. Arachidis* into *Kosakonia* Gen. Nov. as *Kosakonia Cowanii* Comb. Nov., *Kosakonia Radicincitans* Comb. Nov., *Kosakonia Oryzae* Comb. Nov. and *Kosakonia Arachidis* Comb. Nov., Respectively, and *E. Turicensis*, *E. Helveticus* and *E. Pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter Zurichensis* Nom. Nov., *Cronobacter Helveticus* Comb. Nov. and *Cronobacter Pulveris* Comb. Nov., Respectively, and Emended Description of the Genera *Enterobacter* and *Cronobacter*." *Systematic and Applied Microbiology* 36 (5): 309–19.

Bremges A., Maus I., Belmann P., Eikmeyer F., Winkler A., Albersmeier A., Pühler A., Schlüter A., and Sczyrba A. 2015. "Deeply Sequenced Metagenome and Metatranscriptome of a Biogas-Producing Microbial Community from an Agricultural Production-Scale Biogas Plant." *GigaScience* 4 (1). doi: 10.1186/s13742-015-0073-6

Brewer M. S., McKeith F., Martin S. E., Dallmier A. W, and Meyer J. 1991. "Sodium Lactate Effects on Shelf-Life, Sensory, and Physical Characteristics of Fresh Pork Sausage." *Journal of Food Science* 56 (5): 1176–78.

Brillet Anne. 2005. "Sélection et Caractérisation de Souches de *Carnobacterium* Pour La Biopréservation Du Saumon Fumé". Université de Bordeaux. http://archimer.ifremer.fr/doc/2005/these-2414.pdf?

Brown, I. J, Tzoulaki I., Candeias V., and Elliott P. 2009. "Salt Intakes around the World: Implications for Public Health." *International Journal of Epidemiology* 38 (3): 791–813. doi: 10.1093/ije/dyp139.

Browne N., and Dowds B.C.A. 2001. "Heat and Salt Stress in the Food Pathogen *Bacillus Cereus*." *Journal of Applied Microbiology* 91: 1085–94.

C

Cappuccio F. P., Kalaitzidis R., Duneclift S., Eastwood J. B., and et al. 2000. "Unravelling the Links between Calcium Excretion, Salt Intake, Hypertension, Kidney Stones and Bone Metabolism." *Journal of Nephrology* 13 (3): 169–77.

Carraro L., Maifreni M., Bartolomeoli I., Martino M. E., Novelli E., Frigo F., Marino M., and Cardazzo B. 2011. "Comparison of Culture-Dependent and -Independent Methods for

Bacterial Community Monitoring during Montasio Cheese Manufacturing." *Research in Microbiology* 162 (3): 231–39.

Casaburi A., Nasi A., Ferrocino I., Di Monaco R., Mauriello G., Villani F., and Ercolini D. 2011. "Spoilage-Related Activity of *Carnobacterium Maltaromaticum* Strains in Air-Stored and Vacuum-Packed Meat." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (20): 7382–93. doi: 10.1128/AEM.05304-11.

Casaburi A., De Filippis F., Villani F., and Ercolini D. 2014. "Activities of Strains of *Brochothrix Thermosphacta* in Vitro and in Meat." *Food Research International* 62: 366–74. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.019.

Casaburi A., Piombino P., Nychas G-J., Villani F, and Ercolini D. 2015. "Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage." *Food Microbiology* 45: 83–102. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.002.

Casey E., Mosier N. S., Adamec J., Stockdale Z., Ho N., and Sedlak M.. 2013. "Effect of Salts on the Co-Fermentation of Glucose and Xylose by a Genetically Engineered Strain of Saccharomyces Cerevisiae." *Biotechnology for Biofuels* 6 (83).

CE (Comission Européenne) n° 2160/2003. 2003. "Contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques sépécifiques présents dans la chaîne alimentaire."

Chaillou S., Champomier-Vergès M.C., Cornet M, Crutz-Le Coq A-M., Dudez A-M ., Martin V, Beaufils S. et al. 2005. "The Complete Genome Sequence of the Meat-Borne Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus Sakei* 23K." *Nature Biotechnology* 23 (12): 1527–33.

Chaillou S., Christieans S., Rivollier M., Lucquin I., Champomier-Vergès M.C., and Zagorec M. 2014. "Quantification and Efficiency of *Lactobacillus Sakei* Strain Mixtures Used as Protective Cultures in Ground Beef." *Meat Science* 97 (3): 332–38. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.08.009. doi: 10.1038/nbt1160

Chaillou S, Chaulot-Talmon A., Caekebeke H., Cardinal M., Christieans S., Denis C., Desmonts M-H., et al. 2015. "Origin and Ecological Selection of Core and Food-Specific Bacterial Communities Associated with Meat and Seafood Spoilage." *The ISME Journal* 9 (5): 1105–18. doi: 10.1038/ismej.2014.202.

Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connel N., and Alland D. 2007. "A Detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria." *Journal of Microbiological Methods* 69 (2): 330–39..

Champomier-Vergès M-C, Chaillou S., Cornet M., and Zagorec M. 2001. "*Lactobacillus Sakei*: Recent Developments and Future Prospects." *Research in Microbiology* 152: 839–48.

Chan Wendy K.M, Joo S-T., Faustman C., Sun Q., and Vieth R. 1998. "Effect of *Pseudomonas Fluorescens* on Beef Discoloration and Oxymyoglobin Oxidation In Vitro." *Journal of Food Protection®* 6 (10): 1265–1407.

Chao Anne. 1984. "Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population." *Scandinavian Journal of Statistics* 11: 265–70.

Ciqual. 2013. "Table de composition des aliments Ciqual." Available online : https://pro.anses.fr/tableciqual/index.htm

Cocolin L., Manzano M., Aggio D., Cantoni C., and Comi G. 2001. "A Novel Polymerase Chain Reaction (PCR) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for the Identification of *Micrococcaceae* Strains Involved in Meat Fermentations. Its Application to Naturally Fermented Italian Sausages." *Meat Science* 57: 59–64.

Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Urso R., Cantoni C., and Comi G. 2004. "Study of the Ecology of Fresh Sausages and Characterization of Populations of Lactic Acid Bacteria by Molecular Methods." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4): 1883–94. doi: 10.1128/AEM.70.4.1883-1894.2004.

Cocores J. A., and Gold M. S. 2009. “The Salted Food Addiction Hypothesis May Explain Overeating and the Obesity Epidemic.” *Medical Hypotheses* 73 (6): 892–99. doi:10.1016/j.mehy.2009.06.049.

Codex Alimentarius. 1985. “Norme CODEX pour le sel de qualité alimentaire, CODEX STAN 150-1985.”

Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., Chai B., McGarrell D. M., Sun Y., Brown C. T., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., and Tiedje J. M. 2014. “Ribosomal Database Project: Data and Tools for High Throughput rRNA Analysis.” *Nucleic Acids Research* 42 (D1): D633–D642. doi:10.1093/nar/gkt1244.

Collins M. D., Samelis J., Metaxopoulos J., and Wallbanks S. 1993. “Taxonomic Studies on Some Leuconostoc-like Organisms from Fermented Sausages: Description of a New Genus Weissella for the *Leuconostoc Paramesenteroides* Group of Species.” *Journal of Applied Bacteriology* 75: 595–603.

Comi G., and Iacumin L. 2012. “Identification and Process Origin of Bacteria Responsible for Cavities and Volatile off-Flavour Compounds in Artisan Cooked Ham: Spoilage of Cooked Ham.” *International Journal of Food Science & Technology* 47 (1): 114–21. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02816.x.

Creţu C., Floriştean V., Carp-Cărare M., Brădăţan Gh, and Işan E. 2016. “The Influence of pH and Temperature on *Salmonella* Spp. from Fresh, Chilled and Frozen Poultry Carcasses.” Accessed October 28. http://www.uaiasi.ro/CERCET_AGROMOLD/CA2-09-08.pdf.

Csonka L; N. 1989. “Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress.” *Microbiological Reviews* 53 (1):121-147.

D

D’Aoust J-Y. 1989. “Salmonella in Foodborne Bacterial Pathogens (ed. M.P Doyle). Marcel Dekker, Inc. New York, USA, pp. 327-445.

D’Aoust J-Y. 1991. “Pathogenicity of Foodborne Salmonella.” *International Journal of Food Microbiology* 12: 17–40.

Dainty R. H., and Hibbard C. M. 1983. “Precursors of the Major End Products of Aerobic Metabolism of *Brochothrix Thermosphacta*.” *Journal of Applied Bacteriology* 55 (1): 127–33.

Dainty R. H., Edwards R. A., Hibbard C. M., and Ramantanis S. V. 1986. “Bacterial Sources of Putrescine and Cadaverine in Chill Stored Vacuum-Packaged Beef.” *Journal of Applied Bacteriology* 61 (2): 117–23.

Dainty R. H., and Mackey B.M. 1992. “The Relationship between the Phenotypic Properties of Bacteria from Chill-Stored Meat and Spoilage Processes.” *International of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 73: 103–14.

Damon C., Lehembre F., Oger-Desfeux C., Luis P., Ranger J., Fraissinet-Tachet L., and Marmeisse R. 2012. “Metatranscriptomics Reveals the Diversity of Genes Expressed by Eukaryotes in Forest Soils.” *PLoS ONE* 7 (1): e28967. doi:10.1371/journal.pone.0028967.

Dave D., and Ghaly A. E. 2011. “Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review.” *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (4): 486–510.

Davidson PM. 2001. “Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, Food microbiology: Fundamentals and frontiers”. Doyle MP, Beauchat LR, Montville TJ, editors. Washington, DC: ASM Press.

De Filippis F., Pennacchia C., Di Pasqua R., Fiore A., Fogliano V., Villani F., and Ercolini D. 2013a. "Decarboxylase Gene Expression and Cadaverine and Putrescine Production by Serratia Proteamaculans in Vitro and in Beef." *International Journal of Food Microbiology* 165 (3): 332–38. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.021.

De Filippis F., La Storia A., Villani F., and Ercolini D. 2013b. "Exploring the Sources of Bacterial Spoilers in Beefsteaks by Culture-Independent High-Throughput Sequencing." *PLoS ONE* 8 (7): e70222. doi:10.1371/journal.pone.0070222.

De Filippis F., Genovese A., Ferranti P., Gilbert J. A., and Ercolini D. 2016. "Metatranscriptomics Reveals Temperature-Driven Functional Changes in Microbiome Impacting Cheese Maturation Rate." *Scientific Reports* 6: 21871. doi:10.1038/srep21871.

Degirmencioglu N., Esmer O. K., Irkin R., and Degirmencioglu A. 2012. "Effects of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on Shelf Life Extention of Minced Meat Chemical and Microbiological Changes." *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11 (7): 898–911.

Delcenserie V., Taminiau B., Delhalle L., Nezer C., Doyen P., Crevecoeur S., Roussey D., Korsak N., and Daube G. 2014. "Microbiota Characterization of a Belgian Protected Designation of Origin Cheese, Herve Cheese, Using Metagenomic Analysis." *Journal of Dairy Science* 97 (10): 6046–56. doi:10.3168/jds.2014-8225.

DGAL - Direction Générale de l'Alimentation 2012. "Production de Viandes Hachées et Préparations de Viande Dans Les Établissements Agréés Ou Dérogataires À L'agrément. " DGAL/SDSSA/N2012-8181.

Diez A. M., Björkroth J., Jaime I., and Rovira J. 2009. "Microbial, Sensory and Volatile Changes during the Anaerobic Cold Storage of Morcilla de Burgos Previously Inoculated with *Weissella Viridescens* and *Leuconostoc Mesenteroides*." *International Journal of Food Microbiology* 131 (2-3): 168–77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.019.

Ding W., Wang H., and Griffiths M.W. 2005. "Probiotics Down-Regulate flaA σ28 Promoter in Campylobacter Jejuni." *Journal of Food Protection®* 6 (11): 2256–2484.

Dixon N. M., and Kell D. B. 1989. "The Inhibition by COz of the Growth and Metabolism of Micro-Organisms." *Journal of Applied Bacteriology* 67: 109–36.

Doulgeraki A. I., Paramithiotis S., Kagkli D. M., and Nychas G-J. E. 2010. "Lactic Acid Bacteria Population Dynamics during Minced Beef Storage under Aerobic or Modified Atmosphere Packaging Conditions." *Food Microbiology* 27 (8): 1028–34. doi:10.1016/j.fm.2010.07.004.

Doulgeraki A. I., Paramithiotis S., and Nychas G-J. E. 2011. "Characterization of the Enterobacteriaceae Community That Developed during Storage of Minced Beef under Aerobic or Modified Atmosphere Packaging Conditions." *International Journal of Food Microbiology* 145 (1): 77–83. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030.

Doulgeraki A. I., Ercolini D., Villani F., and Nychas G-J E. 2012. "Spoilage Microbiota Associated to the Storage of Raw Meat in Different Conditions." *International Journal of Food Microbiology* 157 (2): 130–41. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.

Dugat-Bony E., Straub C., Teissandier A., Onésime D., Loux V., Monnet C., Irlinger F., et al. 2015. "Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses." *PLOS ONE* 10 (4): e0124360. doi:10.1371/journal.pone.0124360.

Duranton F., Guillou S., Simonin H., Chéret R., and de Lamballerie M. 2012. "Combined Use of High Pressure and Salt or Sodium Nitrite to Control the Growth of Endogenous Microflora in Raw Pork Meat." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16: 373–80. doi:10.1016/j.ifset.2012.08.004.

Dušková M., Kameník J., and Karpíšková R. 2013. "*Weissella Viridescens* in Meat Products – a Review." *Acta Veterinaria Brno* 82 (3): 237–41. doi:10.2754/avb201382030237.

E

EFSA. 2015. "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2013: EU Summary Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks 2013." *EFSA Journal* 13 (1): 3991. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991.

Elijovich F., Weinberger M. H., Anderson C. A.M., Appel L. J., Bursztyn M., Cook N. R., Dart R. A., Newton-Cheh C. H., Sacks F. M., and Laffer C. L. 2016. "Salt Sensitivity of Blood Pressure: A Scientific Statement From the American Heart Association." *Hypertension* 68 (3): e7–e46. doi:10.1161/HYP.0000000000000047.

Elmossalami, E. and Wassf, N. 1971. "Penetration of some microorganism in meat, Zentral-Blattfur Veterinar." *Med*. 18: 229-336.

Ercolini D., Russo F., Torrieri E., Masi P., and Villani F. 2006. "Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 4663–71. doi:10.1128/AEM.00468-06.

Ercolini D., Russo F., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., and Villani F. 2007. "Simultaneous Detection of *Pseudomonas Fragi*, *P. Lundensis*, and *P. Putida* from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the carA Gene." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (7): 2354–59. doi:10.1128/AEM.02603-06.

Ercolini D., Russo F., Nasi A., Ferranti P., and Villani F. 2009. "Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (7): 1990–2001. doi:10.1128/AEM.02762-08.

Ercolini D., Casaburi A., NasiA., Ferrocino I., Di Monaco R., Ferranti P., Mauriello G., and Villani F. 2010. "Different Molecular Types of *Pseudomonas Fragi* Have the Same Overall Behaviour as Meat Spoilers." *International Journal of Food Microbiology* 142 (1-2): 120–31. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.012.

Ercolini D., De Filippis F., La Storia A., and Iacono M. 2012. "Remake by High-Throughput Sequencing of the Microbiota Involved in the Production of Water Buffalo Mozzarella Cheese." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (22): 8142–45. doi:10.1128/AEM.02218-12.

Ercolini D. 2013. "High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (10): 3148–55. doi:10.1128/AEM.00256-13.

Eriksson S., Lucchini S., Thompson A., Rhen M., and Hinton J. C. D. 2003. "Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica." *Molecular Microbiology* 47(1), 103-118.

Esmer O. K., Irkin R., Degirmencioglu N., and Degirmencioglu A. 2011. "The Effects of Modified Atmosphere Gas Composition on Microbiological Criteria, Color and Oxidation Values of Minced Beef Meat." *Meat Science* 88 (2): 221–26. doi:10.1016/j.meatsci.2010.12.021.

F

Fabrega A., and Vila J. 2013. "*Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation." *Clinical Microbiology Reviews* 26 (2): 308–41. doi:10.1128/CMR.00066-12.

Fettweis J. M., Serrano M. G., Girerd P. H., Jefferson K. K., and Buck G. A. 2012. "A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next-Generation Sequencing." *Chemistry & Biodiversity* 9 (5): 965–76. doi:10.1002/cbdv.201100359.

Feurer C., Irlinger F., Spinnler H.E., Glaser P., and Vallaeys T. 2004. "Assessment of the Rind Microbial Diversity in a Farmhouse-Produced vs a Pasteurized Industrially Produced Soft Red-Smear Cheese Using Both Cultivation and rDNA-Based Methods." *Journal of Applied Microbiology* 97 (3): 546–56. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x.

FICT - Fédéraction Française des Industriels Charcutiers Traiteurs. 2016. "Rapport D'activité 2015-2016."

Figueroa G., Troncoso M., López C., Rivas, P. and Toro M. 2009. "Occurrence and Enumeration of *Campylobacter* Spp. during the Processing of Chilean Broilers." *BMC Microbiology* 9 (1): 94. doi:10.1186/1471-2180-9-94.

Fontana A. J. 2001. "Water Activity's Role in Food Safety and Quality." *Food Safety Magazine*. http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2001/water-activitye28099s-role-in-food-safety-and-quality/.

Forde B. M., and O'Toole P. W. 2013. "Next-Generation Sequencing Technologies and Their Impact on Microbial Genomics." *Briefings in Functional Genomics* 12 (5): 440–53. doi:10.1093/bfgp/els062.

Fougy L., Desmonts M-H., Coeuret G., Fassel C., Hamon E., Hézard B., Champomier-Vergès M-C., and Chaillou S. 2016. "Reducing Salt in Raw Pork Sausages Increases Spoilage and Correlates with Reduced Bacterial Diversity." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (13): 3928–39. doi:10.1128/AEM.00323-16.

FranceAgriMer. 2015. "Données et Bilans - Consommation Des Produits Carnés En 2014."

Franzetti L., and Scarpellini M. 2007. "Characterisation of *Pseudomonas* Spp. Isolated from Foods." *Annals of Microbiology* 57 (1): 39–47.

Franzosa E. A., Morgan X. C., Segata N., Waldron L., Reyes J., Earl A. M., Giannoukos G., et al. 2014. "Relating the Metatranscriptome and Metagenome of the Human Gut." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (22): E2329–E2338. doi:10.1073/pnas.1319284111.

Fravalo P., Laisney M-J., Gillard M-O., Salvat G., and M. 2009. "*Campylobacter* Transfer from Naturally Contaminated Chicken Thighs to Cutting Boards Is Inversely Related to Initial Load." *Journal of Food Protection*® 72 (9): 1836–40.

Fuka M. M., Wallisch S., Engel M., Welzl G., Havranek J., and Schloter M. 2013. "Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses." *PLoS ONE* 8 (11): e80734. doi:10.1371/journal.pone.0080734.

Fusco Vincenzina V., Quero G. M., Cho G-S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., and Franz C. M. A. P. 2015. "The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology and Biotechnological Potential." *Frontiers in Microbiology* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00155.

G

Giaccone V., Catellani P., Alberghini L. 2012. "Food as Cause of Human Salmonellosis – Salmonella: a Dangerous Foodborne Pathogen." (ed. Barakat S. M. Mahmoud), pp. 47-73.

Gilbert J. A., Field D., Huang Y., Edwards R., Li W., Gilna P., and Joint I. 2008. "Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities." Edited by Niyaz Ahmed. *PLoS ONE* 3 (8): e3042. doi:10.1371/journal.pone.0003042.

Gill C. O., and Bryant J. 1993. "The Presence of *Escherichia Coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in Pig Carcasses Dehairing Equipement." *Food Microbiology* 10: 337–44.

Giraffa G., and Neviani E. 2001. "DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems." *International Journal of Food Microbiology* 20;67(1-2):19-34.

Gkatzionis K., Yunita D., Linforth R. S. T., Dickinson M., and Dodd C. E. R. 2014. "Diversity and Activities of Yeasts from Different Parts of a Stilton Cheese." *International Journal of Food Microbiology* 177: 109–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016.

Gómez D., Iguácel L., Rota M., Carramiñana J., Ariño A., and Yangüela J. 2015. "Occurrence of Listeria Monocytogenes in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain." *Foods* 4 (3): 271–82. doi:10.3390/foods4030271.

Grimont P. A. D., and Weill F-X. 2007. "Antigenic formulae of the Salmonella serovars." 9th edition. Available online: https://www.pasteur.fr/sites/www.pasteur.fr/files/wklm_en.pdf.

H

Hautefort I., Thompson A., Eriksson-Ygberg S., Parker M. L., Lucchini S., Danino V., Bongaerts R. J. M., Ahmad N., Rhen M., and Hinton J. C. D. 2008. "During Infection of Epithelial Cells *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Undergoes a Time-Dependent Transcriptional Adaptation That Results in Simultaneous Expression of Three Type 3 Secretion Systems." *Cellular Microbiology* 10 (4): 958–84. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01099.x.

Hensel M. 2004. "Evolution of Pathogenicity Islands of *Salmonella Enterica*." *International Journal of Medical Microbiology* 294 (2-3): 95–102. doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.025.

Hernández-Macedo M.L., Contreras-Castillo C.J., Tsai S.M., Da Cruz S.H., Sarantopoulos C.I.G.L., Padula M., and Dias C.T.S. 2012. "Gases and Volatile Compounds Associated with Micro-Organisms in Blown Pack Spoilage of Brazilian Vacuum-Packed Beef." *Letters in Applied Microbiology* 55 (6): 467–75. doi:10.1111/lam.12004.

Hocheberg Y. and Benjamin Y. 1990. "More powerful procedures for multiple significance testing." Stat Med 9(7): 811-8.

Hu P., Xu X.L., Zhou G.H., Han Y.Q., Xu B.C., and Liu J.C. 2008. "Study of the *Lactobacillus Sakei* Protective Effect towards Spoilage Bacteria in Vacuum Packed Cooked Ham Analyzed by PCR–DGGE." *Meat Science* 80 (2): 462–69. doi:10.1016/j.meatsci.2008.01.011.

Hugenholtz P., Goebel B. M., and Pace N. R. 1998. "Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity." *Journal of Bacteriology* 180 (18): 4765–74.

Hulánková R., Bořilová G., and Steinhauserová I. 2010. "Influence of Modified Atmosphere Packaging on the Survival of *Salmonella* Enteritidis PT 8 on the Surface of Chilled Chicken Legs." *Acta Veterinaria Brno* 79 (9): S127–S132. doi:10.2754/avb201079S9S127.

Hultman Jenni, Riitta Rahkila, Javeria Ali, Juho Rousu, and K. Johanna Björkroth. 2015. "Meat Processing Plant Microbiome and Contamination Patterns of Cold-Tolerant Bacteria Causing Food Safety and Spoilage Risks in the Manufacture of Vacuum-Packaged Cooked Sausages." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (20): 7088–97. doi:10.1128/AEM.02228-15.

Humblot C., and J.-P. Guyot. 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 (13): 4354–61. doi:10.1128/AEM.00451-09.

J

Jääskelainen E., Johansson P., Kostiainen O., Nieminen T., Schmidt G., Somervuo P., Mohsina M., Vanninen P., Auvinen P., and Bjorkroth J. 2013. "Significance of Heme-Based Respiration in Meat Spoilage Caused by Leuconostoc Gasicomitatum." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (4): 1078–85. doi:10.1128/AEM.02943-12.

Jääskeläinen E., Hultman J., Parshintsev J., Riekkola M-L., and Björkroth J. 2016. "Development of Spoilage Bacterial Community and Volatile Compounds in Chilled Beef under Vacuum or High Oxygen Atmospheres." *International Journal of Food Microbiology* 223: 25–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.022.

Jacobsen T., Budde B.B, and Koch A. G. 2003. "Application of *Leuconostoc Carnosum* for Biopreservation of Cooked Meat Products." *Journal of Applied Microbiology* 95: 242–49.

Jay J. M., Vilai J. P., and Hughes M. E. 2003. "Profile and Activity of the Bacterial Biota of Ground Beef Held from Freshness to Spoilage at 5–7 °C." *International Journal of Food Microbiology* 81 (2): 105–11.

Johansson P., Paulin L., Sade E., Salovuori N., Alatalo E. R., Bjorkroth K. J., and Auvinen P. 2011. "Genome Sequence of a Food Spoilage Lactic Acid Bacterium, Leuconostoc Gasicomitatum LMG 18811T, in Association with Specific Spoilage Reactions." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (13): 4344–51. doi:10.1128/AEM.00102-11.

Jovanovich S. B., Martinell M., Record M. T., and Burgess R. R. 1988. "Rapid Response to Osmotic Upshift by Osmoregulated Genes in *Escherichia Coli* and *Salmonella* Typhimurium." *Journal of Bacteriology* 170 (2): 534–39.

Jung J. Y., Lee S. H., Kim J. M., Park M. S., Bae J.-W., Hahn Y., Madsen E. L., and Jeon C. O. 2011. "Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (7): 2264–74. doi:10.1128/AEM.02157-10.

Jung J. Y., Lee S. H., Jin H. M., Hahn Y., Madsen E. L., and Jeon C. O. 2013. "Metatranscriptomic Analysis of Lactic Acid Bacterial Gene Expression during Kimchi Fermentation." *International Journal of Food Microbiology* 163 (2-3): 171–79. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.022.

K

Kato Y., Sakala R.M., Hayashidani H., Kiuchi A., Kaneuchi C., and Ogawa M. 2000. "*Lactobacillus Algidus* Sp. Nov., a Psychrophilic Lactic Acid Bacterium Isolated from Vacuum-Packaged Refrigerated Beef." *Interantional Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 50: 1143–49.

Keast R. SJ., and Breslin P. AS. 2003. "An Overview of Binary Taste–taste Interactions." *Food Quality and Preference* 14 (2): 111–24.

Kergourlay G., Taminiau B., Daube G., and Champomier Vergès M-C. 2015. "Metagenomic Insights into the Dynamics of Microbial Communities in Food." *International Journal of Food Microbiology* 213: 31–39. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010.

Kim D.-H., and Austin B. 2008. "Characterization of Probiotic Carnobacteria Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Intestine." *Letters in Applied Microbiology* 47 (3): 141–47. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02401.x.

Kim M, and Chun J. 2005. "Bacterial Community Structure in Kimchi, a Korean Fermented Vegetable Food, as Revealed by 16S rRNA Gene Analysis." *International Journal of Food Microbiology* 103 (1): 91–96. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.030.

Kim M., Morrison M., and Yu Z. 2011. "Evaluation of Different Partial 16S rRNA Gene Sequence Regions for Phylogenetic Analysis of Microbiomes." *Journal of Microbiological Methods* 84 (1): 81–87. doi:10.1016/j.mimet.2010.10.020.

Kim O.-S., Cho Y.-J., Lee K., Yoon S.-H., Kim M., Na H., Park S.-C., et al. 2012. "Introducing EzTaxon-E: A Prokaryotic 16S rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes That Represent Uncultured Species." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62 (Pt 3): 716–21. doi:10.1099/ijs.0.038075-0.

Kiyohara M., Koyanagi T., Matsui H., Yamamoto K., Take H., Katsuyama Y,. Tsuji A., et al. 2012. "Changes in Microbiota Population during Fermentation of *Narezushi* as Revealed by Pyrosequencing Analysis." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76 (1): 48–52. doi:10.1271/bbb.110424.

Kjeldgaard J., Henriksen S., Cohn M. T., Aabo S., and Ingmer H. 2011. "Method Enabling Gene Expression Studies of Pathogens in a Complex Food Matrix." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (23): 8456–58.

Koort J., Murros A., Coenye T., Eerola S., Vandamme P., Sukura A., and Bjorkroth J.. 2005. "*Lactobacillus Oligofermentans* Sp. Nov., Associated with Spoilage of Modified-Atmosphere-Packaged Poultry Products." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (8): 4400–4406. doi:10.1128/AEM.71.8.4400-4406.2005.

Kopf A., Kostadinov I., Wichels A., Quast C., and Glöckner F. O. 2015. "Metatranscriptome of Marine Bacterioplankton during Winter Time in the North Sea Assessed by Total RNA Sequencing." *Marine Genomics* 19: 45–46. doi:10.1016/j.margen.2014.11.001.

Korkeala H., Suortti T., and Mäkela P. 1988. "Ropy Slime Formation in Vacuum-Packed Cooked Meat Products Caused by Heterofermentative *Lactobacilli* and a *Leuconostoc* Species." *International Journal of Food Microbiology* 7: 339–47.

Koutsoumanis K., and Sofos J. N. 2004. "Microbial Contamination of Carcasses and Cuts." *Encyclopedia of Meat Sciences*, 727–37.

Koutsoumanis K.P., Stamatiou A.P., Drosinos E.H., and Nychas G.-J.E. 2008. "Control of Spoilage Microorganisms in Minced Pork by a Self-Developed Modified Atmosphere Induced by the Respiratory Activity of Meat Microflora." *Food Microbiology* 25 (7): 915–21. doi:10.1016/j.fm.2008.05.006.

L

Labadie J. 1999. “Consequences of Packaging on Bacterial Growth. Meat Is an Ecological Niche.” *Meat Science* 52: 299–305.

Lafay L. 2007. “Évolution et Origine Des Apports En Sel Chez Les Adultes: Résultats de L’étude INCA 2.”

Lamkey J.-W., Leak F.W., Tuley W.B., Johnson D.D., and West R. L. 1991. “Assessment of Sodium Lactate Addition to Fresh Pork Sausage.” *Journal of Food Science* 56 (1): 220–23.

Langmead B., and Salzberg S. L. 2012. “Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2.” *Nature Methods* 9 (4): 357–59. doi:10.1038/nmeth.1923.

La Storia A., Ferrocino I., Torrieri E., Di Monaco R., Mauriello G., Villani F., and Ercolini D. 2012. “A Combination of Modified Atmosphere and Antimicrobial Packaging to Extend the Shelf-Life of Beefsteaks Stored at Chill Temperature.” *International Journal of Food Microbiology* 158 (3): 186–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.011.

Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Bosch-Fusté J., and Vidal-Carou M.C. 2012. “Influence of Technological Conditions of Sausage Fermentation on the Aminogenic Activity of L. Curvatus CTC273.” *Food Microbiology* 29 (1): 43–48. doi:10.1016/j.fm.2011.08.004.

Law M. 2000. “Salt, Blood Pressure and Cardiovascular Diseases.” *European Journal of Cardiovascular Risk* 7 (1): 5–8.

Lawrie R.A. 1991. Meat science. Pergamon, Oxford.

Leimena M. M., Ramiro-Garci J., Davids M., Van den Bogert B., Smidt H., Smid E. J., Boekhorst J., Schaap P. J., and Kleerebezem M. 2013. “A Comprehensive Metatranscriptome Analysis Pipeline and Its Validation Using Human Small Intestine Microbiota Datasets.” *BMC Genomics* 14 (530): 1471–2164.

Leisner J. J., Laursen B. G., Prévost H., Drider D., and Dalgaard P. 2007. “*Carnobacterium:* Positive and Negative Effects in the Environment and in Foods.” *FEMS Microbiology Reviews* 31 (5): 592–613. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x.

Leistner L. 1992. “Food preservation by combined methods.” *Food Research International*, 25, 151-8.

Leporq B., Membre J-M., Dervin C., Buche P., and Guyonnet J. 2005. “The ?Sym’Previus? Software, a Tool to Support Decisions to the Foodstuff Safety.” *International Journal of Food Microbiology* 100 (1-3): 231–37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.006.

Leroi F., Fall P. A., Pilet M. F., Chevalier F., and Baron R. 2012. “Influence of Temperature, pH and NaCl Concentration on the Maximal Growth Rate of *Brochothrix Thermosphacta* and a Bioprotective Bacteria *Lactococcus Piscium* CNCM I-4031.” *Food Microbiology* 31 (2): 222–28. doi:10.1016/j.fm.2012.02.014.

Leroy F, Vasilopoulos C., Vanhemelryck S., Falony G., and Devuyst L. 2009. “Volatile Analysis of Spoiled, Artisan-Type, Modified-Atmosphere-Packaged Cooked Ham Stored under Different Temperatures.” *Food Microbiology* 26 (1): 94–102. doi:10.1016/j.fm.2008.08.005.

Lessard M-H., Viel C., St-Gelais D., and Labrie S. 2014. “Metatranscriptome Analysis of Fungal Strains *Penicillium Camemberti* and *Geotrichum Candidum* Reveal Cheese Matrix Breakdown and Potential Development of Sensory Properties of Ripened Camembert-Type Cheese.” *BMC Genomics* 15 (235): 1471–2164.

Lewis G., Randall M. 1923. *Thermodynamics*, New-York

Leyer G. J., and Johnson E. A. 1992. “Acid Adaptation Promotes Survival of Salmonella Spp. in Cheese.” *Applied and Environmental Microbiology* 58 (6): 2075–80.

Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. "The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools." *Bioinformatics* 25 (16): 2078–79. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.

Li W., and Godzik A. 2006. "Cd-Hit: A Fast Program for Clustering and Comparing Large Sets of Protein or Nucleotide Sequences." *Bioinformatics Application Note* 22 (13): 1658–59.

Li X-R., Ma E-B., Yan L-Z., Meng H., Du X-W., Zhang S-W., and Quan Z-X. 2011. "Bacterial and Fungal Diversity in the Traditional Chinese Liquor Fermentation Process." *International Journal of Food Microbiology* 146 (1): 31–37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.030.

Liem D. G., Miremadi F., and Keast R. 2011. "Reducing Sodium in Foods: The Effect on Flavor." *Nutrients* 3 (12): 694–711. doi:10.3390/nu3060694.

Liu F., Yang R-Q., and Li Y-F. 2006. "Correlations between Growth Parameters of Spoilage Micro-Organisms and Shelf-Life of Pork Stored under Air and Modified Atmosphere at −2, 4 and 10°C." *Food Microbiology* 23 (6): 578–83. doi:10.1016/j.fm.2005.10.002.

Lo Fo Wong D. M. A., Hald T., Van Der Wolf P. J., and Swanenburg M. 2002. "Epidemiology and Control Measures for *Salmonella* in Pigs and Pork." *Livestock Production Science* 76: 215–22.

López F. E., de las Mercedes Pescaretti M., Morero R., and Delgado M. A. 2012. "*Salmonella* Typhimurium General Virulence Factors: A Battle of David against Goliath?" *Food Research International* 45 (2): 842–51. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.009.

Lorenzo J. M., Cachaldora A., Fonseca S., Gómez M., Franco I., and Carballo J. 2010. "Production of Biogenic Amines 'in Vitro' in Relation to the Growth Phase by *Enterobacteriaceae* Species Isolated from Traditional Sausages." *Meat Science* 86 (3): 684–91. doi:10.1016/j.meatsci.2010.06.005.

Losantos A., Sanabria C., Cornejo I., and Carrascosa A.V. 2000. "Characterization of *Enterobacteriaceae* Strains Isolated from Spoiled Dry-Cured Hams." *Food Microbiology* 17 (5): 505–12. doi:10.1006/fmic.2000.0350.

Love M. I., Huber W., and Anders S. 2014. "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2." *Genome Biology* 15 (12). doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

Lusk T. S., Ottesen A. R., White J. R., Allard M. W., Brown E. W., and Kase J. A. 2012. "Characterization of Microflora in Latin-Style Cheeses by next-Generation Sequencing Technology." *BMC Microbiology* 12 (254): 1471–2180.

M

Macé S., Cornet J., Chevalier F., Cardinal M., Pilet M-F., Dousset X., and Joffraud J-J. 2012. "Characterisation of the Spoilage Microbiota in Raw Salmon (*Salmo Salar*) Steaks Stored under Vacuum or Modified Atmosphere Packaging Combining Conventional Methods and PCR–TTGE." *Food Microbiology* 30 (1): 164–72. doi:10.1016/j.fm.2011.10.013.

Malicki A., Jarmoluk A., and Bruzcwicz S. 2004. "Effect of Sodium Lactate Used Alone or in Combination with Lysozyme on the Physico-Chemical and Microbiological Properties of Steamed Sausage Stored under the Refrigeration." *Bulletin-Veterinary Institute In pulawy* 48 (1): 47–52.

Mann E., Wetzels S. U., Pinior B., Metzler-Zebeli B. U., Wagner M. and Schmitz-Esser S. 2016. "Psychrophile Spoilers Dominate the Bacterial Microbiome in Musculature Samples of Slaughter Pigs." *Meat Science* 117: 36–40.

doi:10.1016/j.meatsci.2016.02.034.

Maragkoudakis P. A., Mountzouris K. C., Psyrras D., Cremonese S., Fischer J., Cantor M. D., and Tsakalidou E. 2009. "Functional Properties of Novel Protective Lactic Acid Bacteria and Application in Raw Chicken Meat against *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis." *International Journal of Food Microbiology* 130 (3): 219–26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.027.

Marceau A., Zagorec M., Champomier-Vergès M-C. 2003. "Positive Effects of Growth at Suboptimal Temperature and High Salt Concentration on Long-Term Survival of *Lactobacillus Sakei*." *Research in Microbiology* 154 (1): 37–42. doi:10.1016/S0923-2508(02)00010-4.

Marchetti A., Schruth D. M., Durkin C. A., Parker M. S., Kodner R. B., Berthiaume C. T., Morales R., Allen A. E., and Armbrust V. 2012. "Comparative Metatranscriptomics Identifies Molecular Bases for the Physiological Responses of Phytoplankton to Varying Iron Availability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (6): 317–25.

Marcus S. L., Brumell J. H., Pfeifer C. G., and Finlay B. B. 2000. "*Salmonella* Pathogenicity Islands: Big Virulence in Small Packages." *Microbes and Infection* 2 (2): 145–56.

Martínez L., Djenane D., Cilla I., Beltrán J. A., and Roncalés P. 2005. "Effect of Different Concentrations of Carbon Dioxide and Low Concentration of Carbon Monoxide on the Shelf-Life of Fresh Pork Sausages Packaged in Modified Atmosphere." *Meat Science* 71 (3): 563–70. doi:10.1016/j.meatsci.2005.04.041.

Masana M. O., and Baranyi J. 2000. "Growth/no Growth Interface of *Brochothrix Thermosphacta* as a Function of pH and Water Activity." *Food Microbiology* 17 (5): 485–93. doi:10.1006/fmic.2000.0349.

Masco L., Vanhoutte T., Temmerman R., Swings J., and Huys G. 2007. "Evaluation of Real-Time PCR Targeting the 16S rRNA and recA Genes for the Enumeration of Bifidobacteria in Probiotic Products." *International Journal of Food Microbiology* 113 (3): 351–57. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.021.

Mason O. U., Hazen T. C., Borglin S., Chain P. SG., Dubinsky E. A., Fortney J. L., Han J., et al. 2012. "Metagenome, Metatranscriptome and Single-Cell Sequencing Reveal Microbial Response to Deepwater Horizon Oil Spill." *International Society for Microbial Ecology* 6: 1715–27.

Mbandi E., and Shelef L. A. 2002. "Enhanced Antimicrobial Effects of Combination of Lactate and Diacetate on *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella* Spp. in Beef Bologna." *International Journal of Food Microbiology* 76 (3): 191–98.

McEvoy J. M., Doherty A. M., Finnerty M., Sheridan J. J., McGuire L., Blair I. S., McDowell D. A., and Harrington D. 2000. "The Relationship between Hide Cleanliness and Bacterial Numbers on Beef Carcasses at a Commercial Abattoir." *Letters in Applied Microbiology* 30 (5): 390–95.

McMurdie P. J., and Holmes S. 2013. "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data." *PLoS ONE* 8 (4): e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.

Medellin-Pena M. J., Wang H., Johnson R., Anand S., and Griffiths M. W. 2007. "Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression in *Escherichia Coli* O157:H7." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (13): 4259–67. doi:10.1128/AEM.00159-07.

Metaxopoulos J., Mataragas M., and Drosinos E. H. 2002. "Microbial Interaction in Cooked Cured Meat Products under Vacuum or Modified Atmosphere at 4°C." *Journal of Clinical Microbiology* 93: 363–73.

Millemann Y. 1998. "Le Pouvoir Pathogène Des Salmonelles : Facteurs de Virulence et Modèles D'étude." *Veterinary Research* 29: 385–407.

Miller P., Liu X., and McMullen L. M. 2015. "Microbiota of Regular Sodium and Sodium-Reduced Ready-to-Eat Meat Products Obtained from the Retail Market." *Canadian Journal of Microbiology* 61 (2): 150–54. doi:10.1139/cjm-2014-0630.

Mills T. Y, Sandoval N. R., and Gill R. T. 2009. "Cellulosic Hydrolysate Toxicity and Tolerance Mechanisms in *Escherichia Coli*." *Biotechnology for Biofuels* 2 (1): 26. doi:10.1186/1754-6834-2-26.

Møller C.O.A., Ilg Y., Aabo S., Christensen B.B., Dalgaard P., and Hansen T.B. 2013. "Effect of Natural Microbiota on Growth of *Salmonella* Spp. in Fresh Pork – A Predictive Microbiology Approach." *Food Microbiology* 34 (2): 284–95. doi:10.1016/j.fm.2012.10.010.

Monnet C., Dugat-Bony E., Swennen D., Beckerich J-M., Irlinger F., Fraud S., and Bonnarme P.. 2016. "Investigation of the Activity of the Microorganisms in a Reblochon-Style Cheese by Metatranscriptomic Analysis." *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00536.

Montel M-C., Solange Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D. A, Desmasures N., and Berthier F. 2014. "Traditional Cheeses: Rich and Diverse Microbiota with Associated Benefits." *International Journal of Food Microbiology* 177: 136–54. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.

N

Najjari A., Ouzari H., Boudabous A., and Zagorec M. 2008. "Method for Reliable Isolation of *Lactobacillus Sakei* Strains Originating from Tunisian Seafood and Meat Products." *International Journal of Food Microbiology* 121 (3): 342–51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.045.

Nalbantoglu U., Cakar A., Dogan H., AbacI N., Ustek D., Sayood K., and Can H. 2014. "Metagenomic Analysis of the Microbial Community in Kefir Grains." *Food Microbiology* 41: 42–51. doi:10.1016/j.fm.2014.01.014.

Nam Y-D., Lee S-Y., and Lim S-I. 2012. "Microbial Community Analysis of Korean Soybean Pastes by next-Generation Sequencing." *International Journal of Food Microbiology* 155 (1-2): 36–42. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.013.

Ngoan L.T, and Yoshimura T. 2003. "Work, Salt Intake and the Development of Stomach Cancer." *Medical Hypotheses* 60 (4): 552–56. doi:10.1016/S0306-9877(03)00014-8.

Nielsen D. S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A. G., and Arneborg N. 2008. "Occurrence and Growth of Yeasts in Processed Meat Products – Implications for Potential Spoilage." *Meat Science* 80 (3): 919–26. doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.011.

Nieminen T.T., Nummela M., and Björkroth J. 2015. "Packaging Gas Selects Lactic Acid Bacterial Communities on Raw Pork." *Journal of Applied Microbiology* 119 (5): 1310–16. doi:10.1111/jam.12890.

Nishida C., Uauy R., Kumanyika S., and Shetty P. 2004. "The Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Process, Product and Policy Implications." *Public Health Nutrition* 7 (1a). doi:10.1079/PHN2003592.

Nowak A., Rygala A., Oltuszak-Walczak E., and Walczak P. 2012. "The Prevalence and Some Metabolic Traits of *Brochothrix Thermosphacta* in Meat and Meat Products Packaged in Different Ways." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (6): 1304–10. doi:10.1002/jsfa.4701.

Nychas G-J. E., and Tassou C. C. 1996. "Growth/survival of *Salmonella* Enteritidis on Fresh Poultry and Fish Stored under Vacuum or Modified Atmosphere." *Letters in Applied Microbiology* 23 (2): 115–19.

Nychas G-J. E., Skandamis P.N., Tassou C.C., and Koutsoumanis K.P. 2008. "Meat Spoilage during Distribution." *Meat Science* 78 (1-2): 77–89. doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.020.

O

O'Sullivan D. J., Cotter P. D., O'Sullivan O., Giblin L., McSweeney P. L. H., and Sheehan J. J. 2015. "Temporal and Spatial Differences in Microbial Composition during the Manufacture of a Continental-Type Cheese." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (7): 2525–33. doi:10.1128/AEM.04054-14.

Ochieng J. B., Boisen N., Lindsay B., Santiago A., Ouma C., Ombok M., Fields B., Stine O. C., and Nataro J. P. 2014. "*Serratia Marcescens* Is Injurious to Intestinal Epithelial Cells." *Gut Microbes* 5 (6): 729–36. doi:10.4161/19490976.2014.972223.

Ondov B. D, Bergman N. H., and Phillippy A. M. 2011. "Interactive Metagenomic Visualization in a Web Browser." *BMC Bioinformatics* 12 (385): 1471–2105.

Oscar T. P. 2006. "Validation of a Tertiary Model for Predicting Variation of *Salmonella* Typhimurium DT104 (ATCC 700408) Growth from a Low Initial Density on Ground Chicken Breast Meat with a Competitive Microflora." *Journal of Food Protection®* 10 (9): 2048–2303.

Ouattara B., Simard R. E., Holley R. A., Piette G. J-P., and Bégin A. 1997. "Antibacterial Activity of Selected Fatty Acids and Essential Oils against Six Meat Spoilage Organisms." *International Journal of Food Microbiology* 37 (2): 155–62.

P

Papadopoulou O. S., Doulgeraki A. I., Botta C., Cocolin L., and Nychas G-J. E. 2012. "Genotypic Characterization of *Brochothrix Thermosphacta* Isolated during Storage of Minced Pork under Aerobic or Modified Atmosphere Packaging Conditions." *Meat Science* 92 (4): 735–38. doi:10.1016/j.meatsci.2012.06.030.

Park E-J., Chun J., Cha C-J., Park W-S., Jeon C. O., and Bae J-W. 2012. "Bacterial Community Analysis during Fermentation of Ten Representative Kinds of Kimchi with Barcoded Pyrosequencing." *Food Microbiology* 30 (1): 197–204. doi:10.1016/j.fm.2011.10.011.

Peirson M. 2003. "Thermal Resistances and Lactate and Diacetate Sensitivities of Bacteria Causing Bologna Discolouration." *International Journal of Food Microbiology* 86 (3): 223–30. doi:10.1016/S0168-1605(02)00548-2.

Perez K. J., Valim Ceccon R. V., Da Silva Malheiros P., Jong E. V., and Cesar Tondo E.. 2010. "Influence of acid adaptation on the survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella* Typhimurium in simulated gastric fluid and in *rattus norvegicus* intestine infection." *Journal of Food Safety* 30 (2): 398–414. doi:10.1111/j.1745-4565.2010.00215.x.

Pettipher GL., Fulford RJ., and Mabbitt LA. 1983. "Collaborative trial of the direct epifluorescent filter technique (DEFT), a rapid method for counting bacteria in milk." *Journal of Applied Bacteriology*. 54(2):177-82.

Pin C., Hansen T., Muñoz-Cuevas M., de Jonge R., Rosenkrantz J. T., Löfström C., Aarts H., and Olsen J. E. 2012. "The Transcriptional Heat Shock Response of *Salmonella* Typhimurium Shows Hysteresis and Heated Cells Show Increased Resistance to Heat and Acid Stress." Edited by Yolanda Sanz. *PLoS ONE* 7 (12): e51196. doi:10.1371/journal.pone.0051196.

Piotrowska-Cyplik A., Myszka K., Czarny J., Ratajczak K., Kowalski R., Biegańska-Marecik R., Staninska-Pięta J., Nowak J., and Cyplik P. 2016. "Characterization of Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Vacuum-Packed Ham by Culture-Plating Techniques and MiSeq next-Generation Sequencing Technologies." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, April. doi:10.1002/jsfa.7785.

Pisacane V., Callegari M. L., Puglisi E., Dallolio G., and Rebecchi A. 2015. "Microbial Analyses of Traditional Italian Salami Reveal Microorganisms Transfer from the Natural Casing to the Meat Matrix." *International Journal of Food Microbiology* 207 (August): 57–65. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.029.

Pogačić T., Maillard M-B., Leclerc A., Hervé C., Chuat V., Yee A. L., Valence F., and Thierry A.. 2015. "A Methodological Approach to Screen Diverse Cheese-Related Bacteria for Their Ability to Produce Aroma Compounds." *Food Microbiology* 46: 145–53. doi:10.1016/j.fm.2014.07.018.

Pothakos V., Snauwaert C., De Vos P., Huys G., and Devlieghere F. 2014. "Psychrotrophic Members of *Leuconostoc Gasicomitatum*, *Leuconostoc Gelidum* and *Lactococcus Piscium* Dominate at the End of Shelf-Life in Packaged and Chilled-Stored Food Products in Belgium." Food Microbiology 39: 61–67. doi:10.1016/j.fm.2013.11.005.

Pothakos V., Devlieghere F., Villani F., Björkroth J., and Ercolini D. 2015. "Lactic Acid Bacteria and Their Controversial Role in Fresh Meat Spoilage." Meat Science 109: 66–74. doi:10.1016/j.meatsci.2015.04.014.

Pruesse E., Peplies J., and Glockner F. O. 2012. "SINA: Accurate High-Throughput Multiple Sequence Alignment of Ribosomal RNA Genes." *Bioinformatics* 28 (14): 1823–29. doi:10.1093/bioinformatics/bts252.

Q

Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., Nielsen T, et al. 2010. "A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing." *Nature* 464 (7285): 59–65. doi:10.1038/nature08821.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., and Glockner F. O. 2013. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219.

Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., and Cotter P. D. 2012. "High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (16): 5717–23. doi:10.1128/AEM.00918-12.

Quinlan A. R., and Hall I. M. 2010. "BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features." *Bioinformatics Application Note* 26 (6): 841–42.

R

Rao B., Zhang L. Y., Sun J., Su G., Wei D., Chu J., Zhu J., and Shen Y. 2012. "Characterization and Regulation of the 2,3-Butanediol Pathway in *Serratia Marcescens*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (5): 2147–59. doi:10.1007/s00253-011-3608-5.

Rasooly A., and Herold K. E. 2008. "Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies." *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (4).

Rea M.C., Görges S., Gelsomino R., Brennan N.M., Mounier J., Vancanneyt M., Scherer S., Swings J., and Cogan T.M. 2007. "Stability of the Biodiversity of the Surface

Consortia of Gubbeen, a Red-Smear Cheese." *Journal of Dairy Science* 90 (5): 2200–2210. doi:10.3168/jds.2006-377.

Reid C.-A., Avery S. M., Hutchison M. L., and Buncic S. 2002. "Evaluation of Sampling Methods to Assess the Microbiological Status of Cattle Hides." *Food Control* 13 (6): 405–10.

Remenant B., Jaffrès E., Dousset X., Pilet M-F., and Zagorec M. 2015. "Bacterial Spoilers of Food: Behavior, Fitness and Functional Properties." *Food Microbiology* 45: 45–53. doi:10.1016/j.fm.2014.03.009.

Ringo E., Seppola M., Berg A., Olsen R. E., Schillinger U., and Holzapfel W. 2002. "Characterization of *Carnobacterium Divergens* Strain 6251 Isolated from Intestine of Arctic Charr (*Salvelinus Alpinus* L.)." *Systematic and Applied Microbiology* 25: 120–29.

Ritz E. 2010. "Salt and Hypertension: Salt and Hypertension." *Nephrology* 15 (June): 49–52. doi:10.1111/j.1440-1797.2010.01311.x.

Rodriguez M.B.R, Conte Junior C.A., Carneiro C.S., Franco R.M., and Mano S.B. 2014. "The Effect of Carbon Dioxide on the Shelf Life of Ready-to-Eat Shredded Chicken Breast Stored under Refrigeration." *Poultry Science* 93: 194–99.

Rohde A., Hammerl J. A., Appel B., Dieckmann R., and Al Dahouk S. 2015. "FISHing for Bacteria in Food – A Promising Tool for the Reliable Detection of Pathogenic Bacteria?" *Food Microbiology* 46: 395–407. doi:10.1016/j.fm.2014.09.002.

Rouger, A. Hultman J., Remenant B., Prévost H., Björkroth J., and Zagorec M. 2016. Understanding bacterial community dynamics to improve the quality of poultry meat during refrigerated storage. FoodMicro 2016, Dublin, Irlande. Available online: http://www.foodmicro2016.com/wp-content/uploads/2016/07/17.15-amelie-rouger-25016_07_19_FoodMicro_Rouger.pdf

Russo F., Ercolini D., Mauriello G., and Villani F. 2006. "Behaviour of *Brochothrix Thermosphacta* in Presence of Other Meat Spoilage Microbial Groups." *Food Microbiology* 23 (8): 797–802. doi:10.1016/j.fm.2006.02.004.

Ruusunen M. 2001. "Saltiness of Coarsely Ground Cooked Ham with Reduced Salt Content." *Agricultural and Food Science in Finland* 10: 27–32.

S

Säde E., Murros A., and Björkroth J. 2013. "Predominant *Enterobacteria* on Modified-Atmosphere Packaged Meat and Poultry." *Food Microbiology* 34 (2): 252–58. doi:10.1016/j.fm.2012.10.007.

Sakala R.M., Hayashidani H., Kato Y., Kaneuchi C., and Ogawa M. 2002. "Isolation and Characterization of *Lactococcus Piscium* Strains from Vacuum-Packaged Refrigerated Beef." *Journal of Applied Microbiology* 92: 173–79.

Sakamoto N., Tanaka S., Sonomoto K., and 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 (3): 352–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.017.

Sakaridis I., Soultos N., Dovas C.I., Papavergou E., Ambrosiadis I., and Koidis P. 2012. "Lactic Acid Bacteria from Chicken Carcasses with Inhibitory Activity against *Salmonella* Spp. and Listeria Monocytogenes." *Anaerobe* 18 (1): 62–66. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.09.009.

Samelis J., and Georgiadou K. G. 2000. "The Microbial Association of Greek Taverna Sausage Stored at 4 and 10 °C in Air, Vacuum or 100% Carbon Dioxide, and Its Spoilage Potential." *Journal of Applied Microbiology* 88 (1): 58–68.

Sanders P.W. 1996. “Salt-Sensitive Hypertension: Lessons From Animal Models.” *American Journal of Kidney Diseases* 28 (5): 775–762.

Saraoui T., Leroi F., Björkroth J., and Pilet M.F. 2016. “*Lactococcus Piscium* : A Psychrotrophic Lactic Acid Bacterium with Bioprotective or Spoilage Activity in Food-a Review.” *Journal of Applied Microbiology* 121 (4): 907–18. doi:10.1111/jam.13179.

Schirmer B.C., Heir E., and Langsrud S. 2009. “Characterization of the Bacterial Spoilage Flora in Marinated Pork Products.” *Journal of Applied Microbiology* 106 (6): 2106–16. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04183.x.

Schirmer B. C., and Langsrud S. 2010. “Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria *In Vitro* and in Vacuum-Packed Pork Meat.” *Journal of Food Science* 75 (2): M98–M102. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01485.x.

Schmieder R., and Edwards R. 2011. “Quality Control and Preprocessing of Metagenomic Datasets.” *Bioinformatics* 27 (6): 863–64. doi:10.1093/bioinformatics/btr026.

Seideman S. C., Cross H. R., Smith G. C., and Durland P. R. 1984. “Factors Associated with Fresh Meat Color: A Review.” *Journal of Food Quality* 6 (3): 211–37.

Seymour I.J., Cole M.B., and Coote P. J. 1994. “A substrate-mediate assay of bacterial proton efflux/influx to predict the degree of spoilage of beef mince stored at chill temperatures.” *Journal of Applied Microbiology* 76(6): 608-615. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01659.x.

Shen H-W., Yu R-C., and Chou C-C. 2007. “Acid Adaptation Affects the Viability of Salmonella Typhimurium during the Lactic Fermentation of Skim Milk and Product Storage.” *International Journal of Food Microbiology* 114 (3): 380–85. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.033.

Sirsat S. A., Muthaiyan A., and Rickle S. C. 2011. “Optimization of the RNA Extraction Method for Transcriptome Studies of Salmonella Inoculated on Commercial Raw Chicken Breast Samples.” *BMC Research Notes* 4 (60).

Skandamis P, Tsigarida E., and Nychas G-J. E. 2002. “The Effect of Oregano Essential Oil on Survival/death of Salmonella Typhimurium in Meat Stored at 5°C under Aerobic, VP/MAP Conditions.” *Food Microbiology* 19 (1): 97–103. doi:10.1006/fmic.2001.0447.

Stein L. 2013. “Generic feature format version 3 (GFF3).” *Seq. Ontol. Proj*., 1.21.

Stoops J., Ruyters S., Busschaert P., Spaepen R., Verreth C., Claes J., Lievens B., and Van Campenhout L. 2015. “Bacterial Community Dynamics during Cold Storage of Minced Meat Packaged under Modified Atmosphere and Supplemented with Different Preservatives.” *Food Microbiology* 48 (June): 192–99. doi:10.1016/j.fm.2014.12.012.

T

Tangkam W., Comeaux J., Ferguson C. E., and LeMieux F. M. 2012. “Effect of Sodium Lactate and Sodium Acetate on Shelf-Life of Raw Chicken Breasts.” *African Journal of Food Science* 6 (13): 375–80. doi:10.5897/AJFS12.050.

Taormina P. J. 2010. “Implications of Salt and Sodium Reduction on Microbial Food Safety.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50 (3): 209–27. doi:10.1080/10408391003626207.

Todaro M., Francesca N., Reale S., Moschetti G., Vitale F., and Settanni L. 2011. “Effect of Different Salting Technologies on the Chemical and Microbiological Characteristics of PDO Pecorino Siciliano Cheese.” *European Food Research and Technology* 233 (6): 931–40. doi:10.1007/s00217-011-1593-7.

Toldrá F. 1998. “Proteolysis and Lipolysis in Flavour Development of Dry-Cured Meat Products.” *Meat Science* 49 (suppl. 1): 101–10.

Tuomisto H. 2012. “An Updated Consumer’s Guide to Evenness and Related Indices.” *Oikos* 121 (8): 1203–18. doi:10.1111/j.1600-0706.2011.19897.x.

U

Uhart M., Maks N., and Ravishankar S. 2006. “Effect of spices on growth and survival of salmonella typhimurium dt 104 in ground beef stored at 4 and 8°C.” *Journal of Food Safety* 26: 115–25.

Urich T., Lanzén A., Qi J., H. Huson D. H., Schleper C., and C. Schuster S. C. 2008. “Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome.” *PLoS ONE* 3 (6): e2527. doi:10.1371/journal.pone.0002527.

V

Vallenet D., Engelen S., Mornico D., Cruveiller S., Fleury L., Lajus A., Rouy Z., et al. 2009. “MicroScope: A Platform for Microbial Genome Annotation and Comparative Genomics.” *Database* 2009 (0): bap021–bap021. doi:10.1093/database/bap021.

Vasilopoulos C., De Mey E., Dewulf L., Paelinck H., De Smedt A., Vandendriessche F., De Vuyst L., and Leroy F. 2010. “Interactions between Bacterial Isolates from Modified-Atmosphere-Packaged Artisan-Type Cooked Ham in View of the Development of a Bioprotective Culture.” *Food Microbiology* 27 (8): 1086–94. doi:10.1016/j.fm.2010.07.013.

Vermeiren L., Devlieghere F., Vandekinderen I., and Debevere J. 2006. “The Interaction of the Non-Bacteriocinogenic *Lactobacillus Sakei* 10A and Lactocin S Producing Lactobacillus Sakei 148 towards Listeria Monocytogenes on a Model Cooked Ham.” *Food Microbiology* 23 (6): 511–18. doi:10.1016/j.fm.2005.10.005.

Verzani J. 2015. “UsingR: Data Sets, Etc. for the Text ‘Using R for Introductory Statistics.’” http://CRAN.R-project.org/package=UsingR.

W

Wakamatsu J., Nishimura T., and Hattori A. 2004. “A Zn–porphyrin Complex Contributes to Bright Red Color in Parma Ham.” *Meat Science* 67 (1): 95–100. doi:10.1016/j.meatsci.2003.09.012.

Wald A. 1943. “Tests of statistical hypotheses concerning several parameters when the number of observations is large(x).”

Wheatley P., Giotis E. S., and McKevitt A. I. 2014. “Effects of Slaughtering Operations on Carcass Contamination in an Irish Pork Production Plant.” *Irish Veterinary Journal* 67 (1): 1.

Whiting R.C., Benedict R.C., Kunsch C.A., and Woychik J.H. 1984. “Effect of Sodium Chloride Levels in Frankfurters on the Growth of *Clostridium Sporogenes* and *Staphylococcus Aureus*.” *Journal of Food Science* 49: 351–55.

Wickham H., Chang W., and Wickham M. H. 2013. “ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.” ftp://cran.ch.r-project.org/pub/R/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf.

Wolfe B. E., Button J. E., Santarelli M., and Dutton R. J. 2014. “Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity.” *Cell* 158 (2): 422–33. doi:10.1016/j.cell.2014.05.041.

Wright E. S., Yilmaz L. S., and Noguera D. R. 2012. “DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences.” *Applied and Environmental Microbiology* 78 (3): 717–25. doi:10.1128/AEM.06516-11.

Y

Yang B., Wang Y., and Qian P-Y. 2016. “Sensitivity and Correlation of Hypervariable Regions in 16S rRNA Genes in Phylogenetic Analysis.” *BMC Bioinformatics* 17 (1). doi:10.1186/s12859-016-0992-y.

Yu S-L., and Palumbo S. A. 2000. “Enumeration of *aeromonas* for verification of the hygienic adequacy of swine carcass dressing processes1.” *Journal of Food Safety* 20 (1): 43–52.

Z

Zaher S. M., and Fujikawa H. 2011. “Effect of Native Microflora on the Growth Kinetics of Salmonella Enteritidis Strain 04-137 in Raw Ground Chicken.” *Journal of Food Protection®* 8 (5): 700–864.

Zhang Y-G., Shaoping Wu S., Xia Y., and Sun J. 2014. “Salmonella-Infected Crypt-Derived Intestinal Organoid Culture System for Host–bacterial Interactions.” *Physiological Reports* 2 (9).

Zhao F., Zhou G., Ye K., Wang S., Xu X., and Li C. 2015. “Microbial Changes in Vacuum-Packed Chilled Pork during Storage.” *Meat Science* 100: 145–49. doi:10.1016/j.meatsci.2014.10.004.

Zhong M., Yuan Y., Shu S., Sun J., Guo S., Yuan R., and Tang Y. 2016. “Effects of Exogenous Putrescine on Glycolysis and Krebs Cycle Metabolism in Cucumber Leaves Subjected to Salt Stress.” *Plant Growth Regulation* 79 (3): 319–30. doi:10.1007/s10725-015-0136-9.

Zhou K., George S. M., Metris A., Li P. L., and Baranyi J. 2011. “Lag Phase of *Salmonella* Enterica under Osmotic Stress Conditions.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (5): 1758–62. doi:10.1128/AEM.02629-10.

ANNEXES

8. ANNEXES

8.1. Pipeline d'analyse des données de séquençage 16S

Voici ci-dessous les commandes bio-informatiques ainsi que les paramètres utilisés pour chaque étape du traitement de données de séquençage 16S.

Contrôle qualité des séquences

Conversion au format fastqsanger :
sur la plateforme Galaxy (Migale), importer les données brutes de séquençage au format fatsq (les fichiers compressés sont acceptés)
Outil: "NGS: QC and manipulation", FASTQ Groomer

Contrôle qualité
sur la plateforme Galaxy (Migale), vérifier la qualité des séquences
Outil: "NGS: QC and manipulation", FASTQC

Trimming et filtres de qualité :
lancer la ligne de commande, sur les fichiers au format fastqsanger :
prinseq-lite.pl -min_len 350 -max_len 650 -ns_max_n 0 -min_qual_mean 20 -min_qual_score 10 -trim_qual_right 25 -trim_qual_window 4 -trim_right 50 -fastq sample.fastqsanger -out_good sample.trimmed.fasta

min_len : longueur minimale de 350 pb ;
max_len : longueur maximale de 650 pb ;
ns_max_n : absence de base ambigüe (N)
min_qual_mean : qualité moyenne supérieure à 20
min_qual_score : un score de qualité minimum de 10
trim_qual_right : coupure à l'extrémité 3' des nucléotides ayant une qualité inférieure à 25
trim_right : coupure à la position 50
trim_qual_window: taille de fenêtre de 4 pour calculer les scores de qualité

sample.fastqsanger : fichier de séquences brutes au format fastqsanger
sample.trimmed.fasta : fichier des séquences nettoyées

Regroupement des séquences en OTU (clustering)
pour chaque échantillon, lancer le classifier dans RDP (https://pyro.cme.msu.edu/index.jsp, outil RDP aligner)
sample.trimmed.rdp.fasta

Dans RDP, outil complete linkage clustering ; choisir la distance maximale : 3 (divergence de 0,03 %).

Télécharger le fichier .clust (qui contient le nombre d'OTU à chaque valeur de divergence).

Détection et exclusion d'OTU chimériques

détéction
La détection des chimères est réalisée sur les séquences nettoyées, de chaque échantillon à l'aide de l'outil en ligne DECIPHER (http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html).

suppression des OTU chimériques
/projet/micalis/save/lfougy/bin/faSomeRecords -exclude sample.trimmed.rdp.fasta sample.trimmed.decipher.list sample.trimmed.rdp.decipher.fasta

Assignation taxonomique à chaque OTU
séléction de la séquence représentative de chaque OTU
Dans RDP, outil : representative sequence
Fichiers input : sample.trimmed.rdp.fasta et .clust
Télecharger le fichier .txt (qui contient la liste des séquences représentatives pour chaque OTU) → sample.repseq.list
/projet/micalis/save/lfougy/bin/faSomeRecords sample.trimmed.rdp.decipher.fasta sample.repseq.list sample.repseq.fasta

sample.repseq.fasta: séquences représentative de chaque OTU

première assignation – blastn
- Pour chaque échantillon :
formatdb -i LTP-SSU-NR99cdhit-v.111-030413.fasta -p F -o T
blastall –p blastn –i sample.repseq.fasta –d /inputdbPATH/LTP-SSU-NR99cdhit-v.111-030413.fasta –o sample.repseq.blastn –v 1 –b 1 –e 1e-10 –m 9

- Sélection des alignements à plus de 95 % d'identité sur plus de 350 pb
awk '/code*/&&($3 >= 95)&&($4 >= 350) {ORS="\n" ; print $0}' sample.repseq.blastn sample.repseq.blastn.good

$3 : pourcentage d'identité
$4 : longueur d'alignement
$0 : assignation taxonomique

- Sélection des alignements moyens à moins de 95 % d'identité sur plus de 350 pb
awk '/code*/&&($3 < 95)&&($4 >= 350) {ORS="\n" ; print $0}' sample.repseq.blastn sample.repseq.blastn.average

- Sélection des mauvais alignements à moins de 95 % d'identité sur moins de 350 pb
awk '/code*/&&($3 < 95)&&($4 < 350) {ORS="\n" ; print $0}' sample.repseq.blastn sample.repseq.blastn.bad

- Sélection des OTU à alignement unique
awk '{print $2}' sample.repseq.blastn.good |sort|uniq –u grep –F –f sample.repseq.blastn.good > sample.repseq.blastn.good.unique

- Sélection des OTU à alignement multiple
awk '{print $2}' sample.repseq.blastn.good |sort|uniq –d grep –F –f sample.repseq.blastn.good > sample.repseq.blastn.good.multiple

- Sélection des OTU uniques dans le fichier de séquence
/projet/micalis/save/lfougy/bin/faSomeRecords –exclude sample.repseq.level2.fasta sample.repseq.blastn.good.unique sample.repseq.good.unique.fasta

- Sélection des OTU à alignement dans le fichier de séquence
/projet/micalis/save/lfougy/bin/faSomeRecords –exclude sample.repseq.level2.fasta sample.repseq.blastn.good.multiple sample.repseq.multiple.fasta

Pour les OTU à alignements multiples, une expertise est apportée pour le choix de la séquence représentative (sur le fichier sample.repseq.blastn.good.multiple.sorted)

sort –k2,2 –k3,3r sample.repseq.blastn.good.multiple > sample.repseq.blastn.good.multiple.sorted

séquence réprésentative choisie :
sample.repseq.blastn.good.multiple.selected

deuxième assignation
Pour chaque échantillon
(http://www.ezbiocloud.net/eztaxon)
Utiliser : Identifiy > 5’ -> 3’ > unculture
Sur les OTU dont l’alignement est moyen et les mauvais alignements

attribution de l’annotation taxonomique à chaque OTU
cat sample.repseq.blastn.good.multiple.selected >> sample.repseq.good.unique.fasta
cat sample.repseq.Eztaxon >> sample.repseq.good.unique.fasta
Utilisation du script Rename-FastaID2.pl pour nommer les séquences obtenues avec l’assignation de l’OTU :
INPUTPATH/Rename-FastaID2.pl > sample.repseq.OTU.fasta

alignement des sequences contre les séquences représentatives
runMapping -ud -ml 80% -mi 98 -noace -nobam -ref ../cheminduficher/ sample.repseq.OTU.fasta -read ../cheminduficher/ sample.trimmed.fasta

faire une table d’abondance pour chaque échantillon

8.2. Pipeline d'analyse des données de RNAseq

Les commandes bio-informatiques ainsi que les paramètres utilisés pour chaque étape du traitement de données de RNAseq, décrits dans le paragraphe 5.3.3 du chapitre des résultats, sont présentés dans cette annexe.

Étape 2 : nettoyage des séquences

conversion au format fastqsanger :
sur la plateforme Galaxy (Migale), importer les données brutes de séquençage au format fatsq (les fichiers compressés sont acceptés)
Outil: "NGS: QC and manipulation", FASTQ Groomer

contrôle qualité
sur la plateforme Galaxy (Migale), vérifier la qualité des séquences
Outil: "NGS: QC and manipulation", FASTQC

trimming et filtres de qualité :
lancer la ligne de commande, sur les fichiers au format fastqsanger :
prinseq-lite.pl -min_len 20 -min_qual_mean 20 -ns_max_n 0 -trim_qual_right 10 -min_qual_score 10 -fastq file.fastqsanger -out_good file_outgood.fastq

min_len : longueur minimale de 20 pb ;
min_qual_mean : qualité moyenne supérieure à 20
ns_max_n : absence de base ambigüe (N) et
trim_qual_right : coupure à l'extrémité 3' des nucléotides ayant une qualité inférieure à 10
min_qual_score : qualité minimale de 10

file.fastqsanger : fichier de séquences brutes au format fastqsanger
file_outgood.fastq : fichier des séquences nettoyées

Étape 3 : déplétion des ARNr

déplétion des séquences d'ARNr
préparer le script, rbs.depletion.sh :
/usr/local/genome/src/ribopicker-standalone-0.4.3/ribopicker.pl –f file_outgood.fastq -dbs ssr119,slr119 -out_dir RBS-DEPLETION

file_outgood.fastq : fichier des séquences nettoyées
RBS-DEPLETION : répertoire dans lequel se trouveront les fichiers de sortie de la déplétion

lancer le script sur le cluster de calcul, short queue
qsub -q short.q rbs.depletion.sh
renommer les fichiers de sortie : file_outgood.nonrrna.fastqsanger

Étape 4 : analyse exploratoire – identification des espèces bactériennes actives dans les chipolatas

alignement contre la base DB7

créer un lien virtuel – Ce lien permet d'utiliser la base bien que celle-ci ne se trouve pas dans le répertoire de travail
ln -s .. /files directory/DB7

../files directory/ : chemin d'accès à la DB7

indexer la base
Bowtie2-build -f DB7 new.nameDB7
samtools faidx DB7

new.nameDB7 : base DB7 indexée

préparer le script contenant la commande :
bowtie2 -x new.nameDB7 -U.. /file_outgood.nonrrna.fastqsanger -S output-file.sam

file_outgood.nonrrna.fastqsanger : fichiers des séquences nettoyées et déplétées des ARNr
output-file.sam : fichier de sortie de l'alignement contre la DB au format .sam

lancer l'alignement pour chaque échantillon (en cluster de calcul)

Convertir les fichiers (.sam) de l'alignement
samtools view -bt DBPVS.fai output-file.sam > output-file.bam
samtools sort output-file.bam output-file.sort
samtools index output-file.bam
samtools idxstats output-file.sort.bam > output-fileDB7.sort.bam.stat

output-fileDB7.sort.bam.stat : fichier avec les données d'alignement contre les génomes de la DB7 (format texte)

À la suite de cet alignement, on obtient X fichiers de résultats pour les X échantillons.

sélection des références génomiques pour créer la base de données PVS
lister dans un fichier les références génomiques sélectionnées (list.txt)
à partir de cette liste, utiliser l'outil faSomeRecords pour extraire les séquences de la DB7 correspondant aux références génomiques listées
/projet/flec/save/bin/faSomeRecords DB7 list.txt DBPVS.fasta

DBPVS.fasta : la DBPVS contenant les séquences des références génomiques sélectionnées.

Étape 5 : alignement contre les génomes bactériens sélectionnés

alignement contre la base DBPVS
créer un lien virtuel
ln -s .. /files directory/DBPVS

indexer la base
Bowtie2-build -f DBPVS new.nameDBPVS
samtools faidx DBPVS

préparer le script contenant la commande :
bowtie2 -x new.nameDBPVS –U ../file_outgood.nonrrna.fastqsanger -S output-fileDBPVS.sam

file_outgood.nonrrna.fastqsanger : fichiers des séquences nettoyées et déplétées des ARNr
output-fileDPVS.sam : fichier de sortie de l'alignement contre la DBPVS au format .sam

lancer l'alignement pour chaque échantillon

convertir les fichiers (.sam) de l'alignement
samtools view -bt DBPVS.fai output-fileDBPVS.sam > output-fileDBPVS.bam
samtools sort output-fileDBPVS.bam output-fileDBPVS.sort
samtools index output-fileDBPVS.bam
samtools idxstats output-fileDBPVS.sort.bam > output-fileDBPVS.sort.bam.stat

output-fileDBPVS.sort.bam.stat : fichier avec les données d'alignement contre les génomes de la DBPVS. (format texte)

À la suite de cet alignement, on obtient X fichiers de résultats pour les X échantillons.

<u>Étape 6 : identification des gènes exprimés</u>

création du catalogue de gènes
Extraction des séquences des gènes pour chaque génome
- Plateforme MicroScope, pour chaque référence bactérienne : choisir la souche →genome → export → download data → CDS →copier →coller dans un nouveau fichier (un fichier par référence, au format .fasta)
- Remplacer le symbole '| ' par un espace (important pour le clustering des gènes orthologues)

Concaténation des fichiers fasta
cp specie1.fasta species-pangenome.fasta
cat specie2.fasta >> species-pangenome.fasta
cat specieX.fasta >> species-pangenome.fasta

specieX.fasta : fichier comportant les séquences des gènes de la souche X, fichier au format .fasta
species-pangenome.fasta : le fichier comprenant l'ensemble des séquences des gènes de toutes les souches, au format .fasta

vérifier le nombre d'entrées
grep ' > ' species.pangenome.fasta | wc -l

Regroupement des gènes orthologues
- regroupement sur la base des séquences nucléotidiques
cd-hit-est -i species.pangenome.fasta -o species.cdhit -c 0.95 -d 0 -aS 0.80

species.pangenome.fasta : fichier d'entrée (séquences des gènes de toutes les souches)
species.cdhit : fichier de sortie du clustering
options :
c : seuil d'identité du clustering (ici, 95 % d'identité)

d : longueur de description du gène dans le fichier .clstr de sortie. Si d = 0, impression de la description jusqu'au premier espace identifié
aS : couverture d'alignement sur la plus petite séquence (ici 80 %)

- regroupement sur la base des séquences protéiques
cd-hit -i species.pangenome.fasta -o species.cdhit -c 0.80 -d 0 -aS 0.80

cd-hit est l'outil spécifique aux séquences protéiques, les options utilisées sont les mêmes que cd-hit-est

deux fichiers de sortie du clustering :

1. species.cdhit = liste des gènes sélectionnés comme étant la référence de chaque cluster (vérifier le nombre de cluster : grep « > » species.cdhit | wc -l)
2. species.cdhit.clstr = détails de la composition de chaque cluster de gènes orthologues

- trier ce fichier de sortie : cdhit.clstr | perl species.sort.de.pl > species.sort.csv
Ce tri permet de classer dans un tableur la composition de chaque cluster de gènes.

Le fichier de sortie du tri est organisé de la façon suivante :

Col 0	col1	col2	col3	col4	colX
LTstr2	LTstr1	LTstr2	LTstr3	LTstr4	LTstrX

Col 0 : le locus-tag de la référence du cluster de gènes orthologues
Col1 : le locus-tag du gène de la souche 1
C0olX : le locus-tag du gène de la souche X

extraction des coordonnées de position de chaque gène
pour chaque souche (chromosomes et plasmides)
Plateforme MicroScope, pour chaque souche : choisir la souche →genome →export → download data→ Tab delimited →genome →copier →coller dans un nouveau fichier (un fichier par référence) →specieX-gff-genome

Extraction des colonnes $1(locus tag), $4(coord begin), $5(coord end)
awk "{print $1 " " $4 " " $5}" specieX-gff-genome > specieX-coord.awk

ajouter les coordonnées des plasmides correspondants
specieXp-gff-genome (coordonnées des plasmides de la souche X)
awk "{print $1 " " $4 " " $5}" specieXp-gff-genome > specieXp-coord.awk
cat specieXp-coord.awk >> specieX-coord.awk

trier par ordre alphanumérique le fichier de coordonnées specieX-coord.awk
sort -n -t _ +2 -3 specieX-coord.awk > specieX-CDS-coord.sort.awk

specieX-coord.awk : coordonnées des gènes du chromosome et du plasmide de la souche X
specieX-CDS-coord.sort.awk : coordonnées des gènes du chromosome et du plasmide de la souche X triées

Options :
n : tri numérique
t : séparateur de tri
+2 : de la colonne 2

-3 : à la colonne 3

(Les plasmides sont ajoutés à la fin manuellement)

préparation des correspondances de chacun des gènes par rapport à la référence du cluster
Cette étape consiste à faire correspondre chacun des gènes avec la référence du cluster.

à partir du fichier de sortie du clustering trié : species.sort.csv, extraire pour chaque souche tous les gènes de la souche avec les références de clusters de gènes ortologues correspondant

```
awk -F"\t" ‘{print $3 " " $2}’ species.sort.csv > specie1-renaming.v2.awk
awk -F"\t" ‘{print $9 " " $2}’ species.sort.csv > specieX-renaming.v2.awk
```

supprimer les gènes où il n’y a pas de match avec la référence

```
sed ‘/No match/d’ specie1-renaming.v2.awk > specie1-CDS-renaming.v2.awk2
sed ‘ /No match/d’ specieX-renaming.v2.awk > specieX-CDS-renaming.v2.awk2
```

quand deux copies de gènes avec une seule référence, les dissocier sur deux lignes distinctes

```
cat specie1-CDS-renaming.v2.awk2|tr " | " " \n ">specie1-CDS-renaming.v2.awk3
cat specieX-CDS-renaming.v2.awk2|tr "| " " \n ">specieX-CDS-renaming.v2.awk3
```

Rajouter (manuellement) les références aux doublons

trier par ordre alphabétique le fichier

```
sort -n -t _ +2 -3 specie1-CDS-renaming.v2.awk3 > specie1-CDS-renaming.v2.sort.awk
```

avec
-n : tri numérique
-t : séparateur de champ
_ : ici le séparateur est le _
+2 : tri sur le champ 2
-3 : tri jusqu’au champ 3

joindre les fichiers de coordonnées avec les fichiers de références

join specie1-CDS-renaming.v2.sort.awk specie1-CDS-coord.sort.awk > specie1-CDS-gff3-input.v2.join (attention à vérifier l’ordre des gènes dans les 2 fichiers)
join speciex-CDS-renaming.v2.sort.awk specieX-CDS-coord.sort.awk > specieX-CDS-gff3-input.v2.join (attention à vérifier l’ordre des gènes dans les 2 fichiers)

Construction du fichier gff3

```
awk '{ORS="\n" ; print $1,".","cds",$3,$4,".",".",".","ID=",$2}' specie1-CDS-gff3-input.v2.join > specie1-gff3.v2
```

remplacer 'ID= ' par "ID=' sans espace entre ID= et le locus tag (dans nedit)
remplacer l’identifiant du gène (colonne 1) par l’identifiant de la souche de la DBPVS :

```
sed "s/ancien caractère/nouveau caractère/$1" input > output
```

Concaténer l’ensemble de tous les fichiers gff3 (un fichier gff3 par références génomiques)

```
cp specie1-gff3.DB.v2 meta-gff3.v2
cat specieX-gff3.DB.v2 >> meta-gff3.v2
```

Remplacer les espaces par des tabulations :

```
sed 's//\t/g' meta-gff3.v2 > meta-pangenome-gff3.v2
```

bedtools coverage
Cet outil permet d'extraire, à partir des données disponibles dans le fichier gff3, les informations d'alignement des séquences contre les génomes de références contenues dans les fichiers .bam
coverageBed -abam chemin/accès/dossier/alignement/échantillon1.bam -b Meta-pangenome-gff3.v2 > éch1vsDBPVS.cov.txt

Étape 7 : analyse différentielle

analyse différentielle - utilisation du package DESeq2 sous R, les comandes présentées sont celles utilisées pour l'analyse différentielle des gènes exprimés par le métagénome
# installation des librairies
source("http://www.bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite(pkgs=c("DESeq","DESeq2","Biobase","FactoMineR", "gplots"))
library(DESeq2)
library(Biobase)
library(gplots)
library(FactoMineR)
require(RColorBrewer)
sessionInfo()

# chargement de la table de comptage d'abondande des gènes du métagénome
setwd("chemin/complet/du/fichier")
MetaCountTable<-read.table("metatable.txt", header=TRUE, row.names=1)

# informations sur la table de comptage
head(MetaCountTable)
summary(MetaCountTable)

création de l'objet DESeqDataSet
- création de la colData qui décrit le plan d'expérience : "condition", "type"
colData<data.frame(row.names=colnames(MetaCountTable),condition=c(rep("cond1",8),rep("cond2", 8)),libType=c(rep("single-end", 16)))

avec cond1 : condition 1 et cond2 : condition 2 ; "8" : nombre de répétitions par condition ; "single-end": type; "16" : nombre d'échantillons

# création de l'objet dds
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(MetaCountTable, colData, design=~condition)
# visualisation de l'objet dds
class(dds)
colData(dds)
design(dds)

# manipulation de la table de comptage
dim(counts(dds))

exploration des données de comptage
- comptages nuls par échantillon
apply(counts(dds), 2, FUN=function(x) sum(x==0))
- profondeur de séquençage par échantillon

```
colSums(counts(dds))
barplot(colSums(counts(dds)))
```

filtrage des données
- suppression des gènes dont le comptage est nul quelque soit les échantillons et indication de la référence

```
file_pos<-MetaCountTable[rowSums(fileCountTable)>0,]
dds<-DESeqDataSetFromMatrix(file_pos, colData, design=~condition)
colData(dds)$condition <- relevel(colData(dds)$condition, ref="cond1")
dim(counts(dds))
```

avec "ref" : la condition expériementale de référence pour l'analyse différentielle

```
par(mfrow=c(4,4))
for (i in 1 : 16) { hist(log(counts(dds)[,i] +1), breaks=seq(0,14,1), col="grey", cex.lab=0.8, main=colnames(counts(dds))[i], xlab="Valeur du comptage (nbre de reads par gènes) en log (count+1)", ylab="Fréquence du comptage")}
```

normalisation et analyse différentielle
- la fonction DESeq() réalise la normalisation et l'analyse différentielle en une seule étape
- la normalisation des données se fait par la méthode "effective library size"

```
dds<-DESeq(dds)
colData(dds)
```

- visualisation de la normalisation-profondeur de séquençage après normalisation

```
par(mfrow=c(1,1))
colSums(counts(dds, normalized=TRUE))
barplot(colSums(counts(dds, normalized=TRUE)), main="profondeur de séquençage après normalisation")
```

résultats de l'analyse différentielle
- res contient les résultats de l'analyse différentielle

```
res<-results(dds)
head(res)
resultsNames(dds)
mcols(res, use.names=T)
```

- nombre de gènes déclarés DE à 5 %

```
table(res$padj< 0.05, useNA="always")
```

- sélection des gènes déclarés DE à 5 % dans une table ordonnée par p-value croissante

```
resSig <-na.omit(res)
resSig <- resSig[resSig$padj < 0.05, ]
resSig <-resSig[ order(resSig$pval), ]
nrow(resSig)
```

- tableau qui contient les gènes déclarés DE à 5 % et ordonnée par p-value croissante

```
write.table(resSig, file="file-resSig.txt", sep="\t", eol="\n", dec=".")
```

- identification des gènes sur-exprimés

```
over<-resSig[resSig$stat>=0,]
dim(over)
rownames(over)

- identification des gènes sous-exprimés
under<-resSig[resSig$stat<0,]
dim(under)
rownames(under)

# test multiples
- calcul des p-values ajustées selon la méthode Bonferroni
res$padjBonf<-p.adjust(res$pval,meth="bonferroni")
head(res)
```

8.3. Liste des références génomiques de la DB7 (S. Chaillou, communication personnelle)

Les références génomiques non publiques sont indiquées en rouge.

Acinetobacter.baumannii.ACICU
Acinetobacter.baumannii.ACICU.pACICU1
Acinetobacter.baumannii.ACICU.pACICU2
Acinetobacter.baumannii.ATCC17978
Acinetobacter.baumannii.ATCC17978.pAB1
Acinetobacter.baumannii.ATCC17978.pAB2
Acinetobacter.beijerinckii.ANC3835.WGS_6
Acinetobacter.beijerinckii.CIP110307.WGS_5
Acinetobacter.calcoaceticus.CIP81.8.WGS_7
Acinetobacter.calcoaceticus.PHEA2.WGS_1
Acinetobacter.guillouiae.CIP63.46.WGS_16
Acinetobacter.guillouiae.NIPH991.WGS_4
Acinetobacter.johnsonii.ANC3681.WGS_8
Acinetobacter.johnsonii.CIP64.6.WGS_11
Acinetobacter.junii.CIP64.5.WGS_7
Acinetobacter.junii.NIPH182.WGS_9
Acinetobacter.lwoffii.NIPH478.WGS_9
Acinetobacter.lwoffii.WJ10621.WGS_1
Acinetobacter.pittii.ANC4050.WGS_1
Acinetobacter.pittii.CIP70.29.WGS_1
Acinetobacter.soli.CIP110264.WGS_9
Acinetobacter.soli.NIPH2899.WGS_3
Acinetobacter.sp.MN12.WGS_107
Acinetobacter.sp.PCAIE6.10.WGS_329
Aerococcus.urinae.ACS-120-V-COL10A
Aerococcus.urinaeequi.DSM20341.WGS_9
Aerococcus.viridans.ATCC11563.WGS_150
Aerococcus.viridans.LL1.WGS_31
Anoxybacillus.flavithermus.TNO-09.006.WGS_68
Anoxybacillus.flavithermus.WK1
Arthrobacter.nicotinovorans.231SHA2.1M6.WGS_34
Arthrobacter.nicotinovorans.26CVI1.1E.WGS_26
Brochothrix.campestris.DSM4217
Brochothrix.campestris.DSM4217.pA1
Brochothrix.thermosphacta.DSM20171
Brochothrix.thermosphacta.JOUY160X8
Brochothrix.thermosphacta.pJOUY160X8A1
Brochothrix.thermosphacta.CH814
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.WGS_7
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.pDSM5972A1
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.pDSM5972A2
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.pDSM5972A3
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.pDSM5972B
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.pDSM5972C
Carnobacterium.alterfunditum.DSM5972.pDSM5972D
Carnobacterium.divergens.DSM20623
Carnobacterium.divergens.MFPA43A14-05
Carnobacterium.divergens.MFPA43A14-05.pA
Carnobacterium.divergens.MFPA43A14-05.pB
Carnobacterium.divergens.MFPA43A14-05.pC
Carnobacterium.funditum.DSM5970.WGS_2
Carnobacterium.funditum.DSM5970.pDSM5970A
Carnobacterium.gallinarum.DSM4847.WGS_5
Carnobacterium.inhibens.DSM13024.WGS_6
Carnobacterium.inhibens.DSM13024.pDSM13024A1
Carnobacterium.inhibens.DSM13024.pDSM13024A2
Carnobacterium.inhibens.DSM13024.pDSM13024B
Carnobacterium.inhibens.DSM13024.pDSM13024C
Carnobacterium.inhibens.DSM13024.pDSM13024D
Carnobacterium.jeotgali.MS3.WGS_12
Carnobacterium.maltaromaticum.ATCC35586
Carnobacterium.maltaromaticum.DSM20342
Carnobacterium.maltaromaticum.DSM20342.pA1
Carnobacterium.maltaromaticum.DSM20342.pA2
Carnobacterium.maltaromaticum.DSM20342.pB
Carnobacterium.maltaromaticum.DSM20342.pC
Carnobacterium.maltaromaticum.LMA28
Carnobacterium.mobile.DSM4848.WGS_6
Carnobacterium.pleistocenium.FTR1.WGS_4
Carnobacterium.sp.17-4.CHRO
Carnobacterium.sp.17-4.pCAR50
Carnobacterium.sp.AT7.WGS_69
Carnobacterium.sp.WN1359.CHRO
Carnobacterium.sp.WN1359.pWNCR12
Carnobacterium.sp.WN1359.pWNCR15
Carnobacterium.sp.WN1359.pWNCR47
Carnobacterium.sp.WN1359.pWNCR64
Carnobacterium.sp.WN1359.pWNCR9
Carnobacterium.sp.WN1374.WGS_5
Carnobacterium.sp.ZWU0011.WGS_89
Citrobacter.braakii.GTA-CB01.WGS_64
Citrobacter.braakii.GTA-CB04.WGS_17
Citrobacter.freundii.ATCC8090.WGS_129
Citrobacter.freundii.CFNIH1.WGS_1
Citrobacter.freundii.CFNIH1.pKEC-A3C
Citrobacter.freundii.GTC09479.WGS_31
Citrobacter.youngae.ATCC29220.WGS_10
Clostridium.algidicarnis.B3.WGS_1
Clostridium.botulinum.A.ATCC3502
Clostridium.botulinum.A.ATCC3502.pBOT3502
Clostridium.botulinum.B.EKLUND17B
Clostridium.botulinum.B.EKLUND17B.pCLL
Clostridium.botulinum.F.LANGELAND
Clostridium.botulinum.F.LANGELAND.pCLI
Clostridium.celatum.DSM1785.WGS_122
Empedobacter.falsenii.282.WGS_237
Enterobacter.amnigenus.CV9.WGS_180
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ATCC13047
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ATCC13047.pECL_A
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ATCC13047.pECL_B
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ENHKU01
Enterobacter.cloacae.subsp.dissolvens.SDM
Enterobacter.ludwidgii.EN-119.WGS_2
Enterobacter.mori.LMG25706.WGS_23
Enterococcus.avium.ATCC14025
Enterococcus.casseliflavus.ATCC49996.WGS_10
Enterococcus.casseliflavus.EC20
Enterococcus.durans.ATCC6056
Enterococcus.durans.ATCC6056.pB
Enterococcus.durans.IPLA665.WGS_145
Enterococcus.durans.LMG10746.WGS_116
Enterococcus.faecalis.D32
Enterococcus.faecalis.D32.pA
Enterococcus.faecalis.D32.pB
Enterococcus.faecalis.OG1RF
Enterococcus.faecalis.V583
Enterococcus.faecalis.V583.pTEF1
Enterococcus.faecalis.V583.pTEF2
Enterococcus.faecalis.V583.pTEF3
Enterococcus.hirae.ATCC9790
Enterococcus.hirae.ATCC9790.pTG9790
Enterococcus.hirae.ENGEN0127.WGS_10
Enterococcus.hirae.SB10.WGS_65
Enterococcus.malodoratus.ATCC43197.WGS_10
Enterococcus.malodoratus.FAM20855.WGS_41

Enterococcus.mundtii.ATCC882.WGS_2
Enterococcus.mundtii.CRL35.WGS_69
Enterococcus.mundtii.QU25
Enterococcus.mundtii.QU25.pQY024
Enterococcus.mundtii.QU25.pQY039
Enterococcus.mundtii.QU25.pQY082
Enterococcus.mundtii.QU25.pQY182
Facklamia.tabacinasalis.FAM208-56.WGS_86
Hafnia.alvei.ATCC51873.WGS_90
Hafnia.alvei.CIP57.31.WGS_89
Hafnia.alvei.DSM30098.WGS_49
Hafnia.alvei.FB1
Hafnia.paralvei.GTA-HAF03.WGS_47
Janthinobacterium.agaricidamnosum.DSM9628.WGS_1
Janthinobacterium.lividum.MTR.WGS_114
Janthinobacterium.lividum.PAMC25724.WGS_48
Janthinobacterium.lividum.RIT308.WGS_44
Lactobacillus.algidus.CMTALT10
Lactobacillus.algidus.CMTALT10.pB
Lactobacillus.algidus.DSM15638
Lactobacillus.algidus.DSM15638.pDSM15638B
Lactobacillus.animalis.KCTC3501.WGS_7
Lactobacillus.curvatus.CRL705
Lactobacillus.curvatus.CRL705.pRC18
Lactobacillus.curvatus.DSM20019
Lactobacillus.curvatus.F16#9
Lactobacillus.curvatus.F16#9.pF16#9A1
Lactobacillus.curvatus.FLEC03
Lactobacillus.curvatus.FLEC03.pA1
Lactobacillus.curvatus.NRIC0822
Lactobacillus.curvatus.NRIC0822.pA1
Lactobacillus.curvatus.NRIC0822.pB
Lactobacillus.farciminis.DSM20184.WGS_5
Lactobacillus.fuchuensis.JCM11249
Lactobacillus.fuchuensis.MFPC41A28-01
Lactobacillus.fuchuensis.MFPC41A28A-01.pA
Lactobacillus.graminis.DSM20719
Lactobacillus.graminis.DSM20719.pDSM20719A1
Lactobacillus.hokkaidonensis.LOOC260
Lactobacillus.hokkaidonensis.LOOC260.p1
Lactobacillus.hokkaidonensis.LOOC260.p2
Lactobacillus.malefermentans.DSM5705.WGS_172
Lactobacillus.oligofermentans.DSM15707
Lactobacillus.ruminis.ATCC27782
Lactobacillus.sakei.23K
Lactobacillus.sakei.pJ23A1
Lactobacillus.sakei.ATCC15521
Lactobacillus.sakei.ATCC15521.pA3
Lactobacillus.sakei.ATCC15521.pD
Lactobacillus.sakei.DSM15831
Lactobacillus.sakei.DSM15831.pA1
Lactobacillus.sakei.DSM15831.pB
Lactobacillus.sakei.FLEC01
Lactobacillus.sakei.FLEC01.pA2
Lactobacillus.sakei.FLEC01.pB
Lactobacillus.sakei.FLEC01.pC
Lactobacillus.sakei.JOUY112
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pA1
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pB
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pC
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pD
Lactobacillus.sakei.JOUY156
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pA1
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pB
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pC
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pD
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pE
Lactobacillus.sakei.JOUY160X1
Lactobacillus.sakei.JOUY160.pA1
Lactobacillus.sakei.JOUY160.pE
Lactobacillus.sakei.JOUY18
Lactobacillus.sakei.JOUY54
Lactobacillus.sakei.JOUY54.pA1
Lactobacillus.sakei.JOUY54.pC
Lactobacillus.sakei.JOUY64
Lactobacillus.sakei.JOUY64.pA2
Lactobacillus.sakei.LS25
Lactobacillus.sakei.LS25.pA1
Lactobacillus.sakei.MFPB16A14-01
Lactobacillus.sakei.MFPB16A14-01.pA1
Lactobacillus.sakei.MFPB19A15-01
Lactobacillus.sakei.MFPB19A15-01.pA1
Lactobacillus.sakei.MFPB19A15-01.pB
Lactobacillus.sakei.MFPB19A15-01.pC
Lactobacillus.sakei.WIKIM22
Lactobacillus.sakei.WIKIM22.pA2
Lactobacillus.sakei.WIKIM22.pB
Lactobacillus.sakei.p332A2
Lactococcus.garvieae.LG2
Lactococcus.lactis.IL1403
Lactococcus.piscium.CMTALT02
Lactococcus.piscium.CMTALT02.pA
Lactococcus.piscium.CMTALT02.pB
Lactococcus.piscium.CMTALT02.pC
Lactococcus.piscium.CMTALT17
Lactococcus.piscium.MKFS47
Lactococcus.piscium.MKFS47.pA1
Lactococcus.piscium.MKFS47.pA2
Lactococcus.raffinolactis.4877
Lelliottia.amnigena.CHS78.WGS_9
Leuconostoc.carnosum.JB16.CHRO
Leuconostoc.carnosum.JB16.pKLC1
Leuconostoc.carnosum.JB16.pKLC2
Leuconostoc.carnosum.JB16.pKLC3
Leuconostoc.carnosum.JB16.pKLC4
Leuconostoc.carnosum.MFPA29A14-05
Leuconostoc.carnosum.MFPA29A14-05.pB
Leuconostoc.carnosum.MFPA29A14-05.pC
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pA
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pB
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pC
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pE
Leuconostoc.citreum.KM20
Leuconostoc.citreum.KM20.pLCK1
Leuconostoc.citreum.KM20.pLCK2
Leuconostoc.citreum.KM20.pLCK3
Leuconostoc.citreum.KM20.pLCK4
Leuconostoc.citreum.LBAEC10.WGS_76
Leuconostoc.citreum.LBAEC11.WGS_83
Leuconostoc.citreum.LBAEE16.WGS_45
Leuconostoc.citreum.MS2.WGS_73
Leuconostoc.fallax.KCTC3537.WGS_30
Leuconostoc.gelidum.subsp.*gasicomitatum*.LMG18811
Leuconostoc.gelidum.subsp.*gasicomitatum*.MFPA44A14-01
Leuconostoc.gelidum.subsp.*gasicomitatum*.MFPA44A14-01.pB
Leuconostoc.gelidum.subsp.*gelidum*.JB7
Leuconostoc.gelidum.subsp.*gelidum*.KCTC3537
Leuconostoc.gelidum.subsp.*gelidum*.KCTC3537.pB
Leuconostoc.inhae.KCTC3774.WGS_893
Leuconostoc.kimchii.IMSNU11154
Leuconostoc.kimchii.IMSNU11154.pL4701
Leuconostoc.kimchii.IMSNU11154.pL4704
Leuconostoc.kimchii.IMSNU11154.pL4719

Leuconostoc.kimchii.IMSNU11154.pL4726
Leuconostoc.kimchii.IMSNU11154.pL48
Leuconostoc.lactis.DSM20202.WGS_1151
Leuconostoc.lactis.KACC91922.WGS_35
Leuconostoc.lactis.KCTC3773.WGS_93
Leuconostoc.mesenteroides.ATCC8293.CHRO
Leuconostoc.mesenteroides.ATCC8293.PLEUM1
Leuconostoc.mesenteroides.CNRZ1283.WGS_88
Leuconostoc.mesenteroides.J18
Leuconostoc.mesenteroides.J18.pKLE01
Leuconostoc.mesenteroides.J18.pKLE02
Leuconostoc.mesenteroides.J18.pKLE03
Leuconostoc.mesenteroides.J18.pKLE04
Leuconostoc.mesenteroides.KFRI-MG
Leuconostoc.mesenteroides.P45.WGS_6
Leuconostoc.mesenteroides.subsp.*cremoris*.ATCC19254.WGS_29
Leuconostoc.mesenteroides.subsp.*cremoris*.T26.WGS_123
Leuconostoc.mesenteroides.subsp.*cremoris*.TIFN8.WGS_173
Leuconostoc.pseudomesenteroides.1159.WGS_100
Leuconostoc.pseudomesenteroides.4882.WGS_106
Leuconostoc.pseudomesenteroides.MSE7.WGS_179
Leuconostoc.pseudomesenteroides.PS12.WGS_91
Leuconostoc.sp.C2.WGS_1
Listeria.monocytogenes.EGD
Macrococcus.caseolyticus.ATCC13458.WGS_50
Macrococcus.caseolyticus.JCSC5402
Macrococcus.caseolyticus.JCSC5402.pMCCL2
Morganella.morganii.subsp.MORGANII.KT.WGS_1
Morganella.morganii.subsp.SIBONI.3A5A.WGS_23
Morganella.psychrotolerans.925.WGS_82
Myroides.odoratimus.CIP101113.WGS_3
Myroides.profundi.D25.WGS_1
Pantoea.agglomerans.299R.WGS_109
Pantoea.agglomerans.IG1.WGS_18
Pantoea.agglomerans.IG1.WGS_5
Pantoea.agglomerans.TX10.WGS_22
Photobacterium.iliopiscarium.ATCC51760.WGS_140
Photobacterium.iliopiscarium.ATCC51761.WGS_289
Photobacterium.kishitanii.ATCCBAA-1194.WGS_117
Photobacterium.kishitanii.GCSL-A1-3.WGS_102
Photobacterium.phosphoreum.ANT220.WGS_19
Photobacterium.phosphoreum.ATCC11040.WGS_164
Pseudomonas.abietaniphila.KF17.WGS_107
Pseudomonas.aeruginosa.PAO1
Pseudomonas.agarici.NCPPB2289.WGS_119
Pseudomonas.alcaligenes.OT69.PAE-GROUP.WGS_223
Pseudomonas.alcaliphila.34.WGS_18
Pseudomonas.alkylphenolia.KL28
Pseudomonas.amygdali.ATCC11528.PSY-GROUP.WGS_18
Pseudomonas.avellanae.BPIC631.PSY-GROUP.WGS_297
Pseudomonas.azotofigens.DSM17556.WGS_59
Pseudomonas.balearica.DSM6083.PST-GROUP
Pseudomonas.batumici.UCMB-321.WGS_126
Pseudomonas.bausanensis.W13Z2.WGS_69
Pseudomonas.brassicacearum.NFM421
Pseudomonas.caeni.DSM24390.PAE-GROUP.WGS_24
Pseudomonas.chloritidismutans.AW1.PST-GROUP.WGS_24
Pseudomonas.chlororaphis.JD37
Pseudomonas.chlororaphis.PA23
Pseudomonas.chlororaphis.PCL1606
Pseudomonas.chlororaphis.PCL1606.pA1
Pseudomonas.cichorii.JBC1.PSY-GROUP
Pseudomonas.extremaustralis.14-3
Pseudomonas.fluorescens.F113
Pseudomonas.fluorescens.PF0-1
Pseudomonas.fluorescens.SBW25
Pseudomonas.fragi.1E26
Pseudomonas.fragi.A22
Pseudomonas.fragi.B25
Pseudomonas.ludensis.MFPA15A12-05
Pseudomonas.ludensis.PCAI2.2
Pseudomonas.protegens.CHA0
Pseudomonas.protegens.PF5
Pseudomonas.psychrophila.HA-4
Pseudomonas.psychrotolerans.L19
Pseudomonas.putida.F1
Pseudomonas.putida.GB-1
Pseudomonas.putida.W619
Pseudomonas.sp.1E44
Pseudomonas.syringae.B728A
Pseudomonas.syringae.CC1557
Pseudomonas.syringae.CC1557.pA
Psychrobacter.aquaticus.CMS56.WGS_38
Psychrobacter.aquimaris.ER15174.WGS_94
Psychrobacter.articus.273-4
Psychrobacter.celer.91.WGS_102
Psychrobacter.cryohalolentis.K5
Psychrobacter.faecalis.H5.WGS_120
Psychrobacter.immobilis.PG1.WGS_70
Psychrobacter.lutiphocae.DSM20542.WGS_79
Psychrobacter.namhaensis.1439.WGS_66
Psychrobacter.sp.G.WGS_1
Psychrobacter.sp.PAMC21119.WGS_42
Psychrobacter.sp.PRWF-1.WGS_1
Rahnella.aquatilis.CIP78.65
Rahnella.aquatilis.CIP78.65.pRAHAQ201
Rahnella.aquatilis.CIP78.65.pRAHAQ202
Rahnella.aquatilis.CIP78.65.pRAHAQ203
Rahnella.aquatilis.HX2
Rahnella.aquatilis.HX2.pPRA1
Rahnella.aquatilis.HX2.pPRA2
Rahnella.aquatilis.HX2.pPRA22
Raoultella.ornithinolytica.B6.WGS_1
Raoultella.ornithinolytica.S12.WGS_1
Raoultella.planticola.ATCC33531.WGS_83
Raoultella.planticola.CHB.WGS_18
Serratia.fonticola.AU-AP2C.WGS_34
Serratia.fonticola.AU-P3.WGS_44
Serratia.grimesii.A2
Serratia.liquefaciens.ATCC27592
Serratia.liquefaciens.ATCC27592.pA
Serratia.liquefaciens.FK01.WGS_28
Serratia.liquefaciens.HUMV-21.WGS_1
Serratia.marcescens.DB11.WGS_1
Serratia.marcescens.FGI94
Serratia.marcescens.SM39.WGS_1
Serratia.marcescens.SM39.pSMC1
Serratia.marcescens.SM39.pSMC2
Serratia.marcescens.WW4.WGS_1
Serratia.marcescens.PSMWW4
Serratia.plymuthica.4RX13
Serratia.plymuthica.4RX13.p75
Serratia.plymuthica.AS9
Serratia.plymuthica.RVH1
Serratia.plymuthica.S13
Serratia.proteamaculans.1C2F
Serratia.proteamaculans.1C2F.pA
Serratia.proteamaculans.568
Serratia.proteamaculans.568.pSPRO01
Serratia.proteamaculans.MFPA44A14-05
Serratia.proteamaculans.subsp.*quinivorans*.DSM4597
Serratia.proteamaculans.subsp.*quinivorans*.DSM4597.pA
Serratia.proteamaculans.subsp.*quinivorans*.DSM4597.pB
Serratia.proteamaculans.subsp.*quinivorans*.DSM4597.pC

Serratia.rubidaea.TA26.WGS_278
Serratia.sp.AS12
Serratia.sp.AS13
Staphylococcus.arlettae.CVD059.WGS_57
Staphylococcus.aureus.MRSA252
Staphylococcus.aureus.MU50
Staphylococcus.aureus.MU50.pVRSA
Staphylococcus.carnosus.LTH7013.WGS_34
Staphylococcus.carnosus.TM300.WGS_1
Staphylococcus.cohnii.532.WGS_16
Staphylococcus.cohnii.57.WGS_20
Staphylococcus.epidermidis.ATCC12228
Staphylococcus.epidermidis.ATCC12228.pSE-12228-04
Staphylococcus.epidermidis.ATCC12228.pSE-12228-05
Staphylococcus.epidermidis.RP62A
Staphylococcus.epidermidis.RP62A.pSERP
Staphylococcus.equorum.G8HB1.WGS_22
Staphylococcus.equorum.MU2.WGS_30
Staphylococcus.fleurettii.CIP106114.WGS_88
Staphylococcus.haemolyticus.JCSC1435
Staphylococcus.haemolyticus.JCSC1435.pSHAEA
Staphylococcus.haemolyticus.JCSC1435.pSHAEC
Staphylococcus.haemolyticus.SH29
Staphylococcus.lentus.CA2.WGS_51
Staphylococcus.lentus.F1142.WGS_169
Staphylococcus.pasteuri.BAB3.WGS_32
Staphylococcus.pasteuri.SP1.WGS_1
Staphylococcus.saprophyticus.ATCC15305
Staphylococcus.saprophyticus.SU8.WGS_44
Staphylococcus.succinus.DSM14617.WGS_162
Staphylococcus.vitulinus.F1028.WGS_223
Staphylococcus.vitulinus.MA1.WGS_106
Staphylococcus.warneri.NGS-ED1001.WGS_12
Staphylococcus.warneri.SG1
Staphylococcus.xylosus.C2A
Staphylococcus.xylosus.SMQ121
Streptococcus.parauberis.KCTC11537
Streptococcus.parauberis.NCFD2020.WGS_1
Vagococcus.fluvialis.CIP102976
Vagococcus.fluvialis.CIP102976.pA1
Vagococcus.fluvialis.BH819
Vagococcus.fluvialis.BH819pA
Vagococcus.fluvialis.BH819pB
Vagococcus.fluvialis.BH819pC
Vagococcus.lutrae.FAM208
Vagococcus.lutrae.LBD1
Weissella.ceti.WS08
Weissella.ceti.WS105
Weissella.ceti.WS74
Weissella.cibaria.AB3B
Weissella.cibaria.AB3B.pA1
Weissella.cibaria.MG1
Weissella.cibaria.MG1.pA1
Weissella.confusa.LBAEC392
Weissella.halotolerans.DSM20190
Weissella.hellenica.WIKIM14.WGS_30
Weissella.koreensis.KACC15510
Weissella.koreensis.KACC15510.pWK2903
Weissella.koreensis.KCTC3631
Weissella.koreensis.KCTC3631.pA
Weissella.minor.DSM20014
Weissella.minor.DSM20014.pB
Weissella.oryzae.SG25.WGS_72
Weissella.paramesenteroides.ATCC33313
Weissella.viridescens.CIP102810
Weissella.viridescens.MFPC16A28-05
Weissella.viridescens.MFPC16A28-05.pB
Weissella.viridescens.MFPC16A28-05.pC
Yersinia.aldovae.670-83.WGS_1
Yersinia.aldovae.ATCC35236.WGS_210
Yersinia.enterocolitica.subsp.*enterocolitica*.8081.WGS_1
Yersinia.enterocolitica.subsp.*enterocolitica*.8081.pYVE8081
Yersinia.enterocolitica.subsp.*paleartica*.Y11
Yersinia.intermedia.ATCC29909.WGS_123
Yersinia.intermedia.Y228.WGS_1
Yersinia.kristensenii.ATCC33639.WGS_1
Yersinia.kristensenii.Y231.WGS_1
Yersinia.mollaretii.ATCC43969.WGS_169

8.4. Liste des références génomiques de la DBPVS

Les références génomiques non publiques sont indiquées en rouge.

Aerococcus.viridans.ATCC11563.WGS_150
Brochothrix.thermosphacta.CH814
Brochothrix.thermosphacta.JOUY160X8
Brochothrix.thermosphacta.JOUY160X8.pA1
Carnobacterium.divergens.DSM20623
Carnobacterium.maltaromaticum.ATCC35586
Citrobacter.braackii.GTA-CB01.WGS_64
Citrobacter.freundii.GTC09479.WGS_31
Citrobacter.youngae.ATCC29220.WGS_10
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ATCC13047
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ATCC13047.pECL_A
Enterobacter.cloacae.subsp.cloacae.ATCC13047.pECL_B
Enterobacter.ludwidgii.EN-119.WGS_2
Enterobacter.mori.LMG25706.WGS_23
Enterococcus.avium.ATCC14025
Enterococcus.durans.ATCC6056
Enterococcus.durans.ATCC6056.pB
Enterococcus.durans.IPLA665.WGS_145
Enterococcus.faecalis.V583
Enterococcus.faecalis.V583.pTEF1
Enterococcus.faecalis.V583.pTEF2
Enterococcus.faecalis.V583.pTEF3
Enterococcus.hirae.ATCC9790
Enterococcus.hirae.ATCC9790.pTG9790
Enterococcus.malodoratus.ATCC43197.WGS_10
Hafnia.alvei.DSM30098.WGS_49
Hafnia.paralvei.GTA-HAF03.WGS_47
Lactobacillus.algidus.CMTALT10
Lactobacillus.algidus.CMTALT10.pB
Lactobacillus.algidus.DSM15638
Lactobacillus.algidus.DSM15638.pDSM15838B
Lactobacillus.curvatus.FLEC03
Lactobacillus.curvatus.FLEC03.pA1
Lactobacillus.fuchuensis.MFPC41A28-01
Lactobacillus.fuchuensis.MFPC41A28-01.pA
Lactobacillus.graminis.DSM20719
Lactobacillus.graminis.DSM20719.pDSM20719A1
Lactobacillus.hokkaidonensis.LOOC260
Lactobacillus.hokkaidonensis.LOOC260.p1
Lactobacillus.hokkaidonensis.LOOC260.p2
Lactobacillus.malefermentans.DSM5705.WGS_172
Lactobacillus.oligofermentans.DSM15707
Lactobacillus.sakei.23K
Lactobacillus.sakei.JOUY23.pA
Lactobacillus.sakei.JOUY112
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pA
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pB
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pC
Lactobacillus.sakei.JOUY112.pD
Lactobacillus.sakei.JOUY156
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pA1
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pB
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pC
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pD
Lactobacillus.sakei.JOUY156.pE
Lactobacillus.sakei.JOUY160X1
Lactobacillus.sakei.JOUY160.pA1
Lactobacillus.sakei.JOUY160.pE
Lactobacillus.sakei.JOUY18
Lactobacillus.sakei.LS25
Lactobacillus.sakei.LS25.pA1
Lactobacillus.sakei.MFPB16A14-01
Lactobacillus.sakei.MFPB16A14-01.pA1
Lactococcus.piscium.CMTALT02
Lactococcus.piscium.CMTALT02.pA1
Lactococcus.piscium.CMTALT02.pB
Lactococcus.piscium.CMTALT02.pC
Lactococcus.piscium.CMTALT17
Lactococcus.piscium.MKFS47
Lactococcus.piscium.MKFS47.pA1
Lactococcus.piscium.MKFS47.pA2
Lelliottia.amnigena.CHS78.WGS_9
Lelliottia.amnigena.CV9.WGS_180[a]
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pA
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pB
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pC
Leuconostoc.carnosum.MFPC16A28-03.pE
Leuconostoc.citreum.LBAEC11.WGS_83
Leuconostoc.gelidum.KCTC3537
Leuconostoc.gelidum.KCTC3537.pB
Leuconostoc.gelidum.MFPA44A14-01
Leuconostoc.gelidum.MFPA44A14-01.pB
Leuconostoc.mesenteroides.ATCC8293.CHRO
Leuconostoc.mesenteroides.ATCC8293.pLEUM1
Morganella.psychrotolerans.925.WGS_82
Pantoea.agglomerans.IG1.WGS_18
Pseudomonas.aeruginosa.PAO1
Rahnella.aquatilis.HX2
Rahnella.aquatilis.HX2.pPRA1
Rahnella.aquatilis.HX2. pPRA2
Rahnella.aquatilis.HX2. pPRA22
Raoultella.ornithinolytica.S12.WGS_1
Raoultella.planticola.CHB.WGS_18
Serratia.fonticola.AU-AP2C.WGS_34
Serratia.grimesii.A2
Serratia.liquefaciens.ATCC27592
Serratia.liquefaciens.ATCC27592.pA
Serratia.liquefaciens.KF01.WGS_28
Serratia.marcescens.FGI94
Serratia.plymuthica.AS9
Serratia.plymuthica.S13
Serratia.proteamaculans.1C2F
Serratia.proteamaculans.1C2FpA
Serratia.proteamaculans.MFPA44A14-05
Vagococcus.fluvialis.BH819
Vagococcus.fluvialis.BH819.pA
Vagococcus.fluvialis.BH819.pB
Vagococcus.fluvialis.BH819.pC
Weissella.hellenica.WIKIM14.WGS_30
Yersinia.enterocolitica.subsp.*enterocolitica*.8081.WGS_1
Yersinia.enterocolitica.subsp.*enterocolitica*.8081.pYVE8081
Yersinia.intermedia.Y228.WGS_1
Yersinia.kristensenii.Y231.WGS_1

[a]Cette référence génomique correspond à la référence génomique *Enterobacter.amingenus*.CV9.WGS_180 de la DB7

8.5. Gènes du métagénome impliqués dans les processus cellulaires et sous-exprimés quand la teneur en sel est réduite

Nom du gène[1]	Annotation automatique du produit	Analyse différentielle des gènes du métagénome		
		Locus-tag[2]	Facteur[3]	Abondance totale
Motilité cellulaire				
fimA	type-1 fimbrial protein subunit	SPR1C2F_v1_260058	25,3	195
F17a-A	F17 fimbrial protein	SPRA44_v1_220047	12,4	436
Mécanismes de défense				
CDIDSM_v1_21719	hypothetical permease protein	CDIDSM_v1_21719	18,2	96
Trafic intracellulaire, sécrétion et transport vésiculaire				
secG	preprotein translocase membrane subunit	ABWL_v1_250108	18,1	287
secE	preprotein translocase membrane subunit	SPR1C2F_v1_90007	9,1	750
Contrôle du cycle cellulaire				
ftsL	membrane bound cell division protein at septum containing leucine zipper motif	SPR1C2F_v1_170022	9,8	134
mreB	rod shape-determining protein	SPR1C2F_v1_790013	8,3	569
Mécanismes du signal de transduction				
rseB	anti-sigma factor	AOMSv1_270017	33,3	99
typA	ribosome-associated GTPase	CDIDSM_v1_21502	12,2	349
Modifications post-traductionnelles, turnover protéiques, chaperones				
ahpC	alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like, detoxification of hydroperoxides	ABWL_v1_70139	25,5	347
		RPLCHB_v1_40068	37,2	91
anmK	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	SPR1C2F_v1_310029	15,1	103
clpY	two-component ATP-dependent protease (ATPase and chaperone)	CDIDSM_v1_21321	18,2	118
dsbB	oxidoreductase that catalyzes reoxidation of DsbA protein disulfide isomerase I	SPR1C2F_v1_400011	14,6	84
ftsH	protease, ATP-dependent zinc-metallo	CBRB01_v1_20898	23,7	224
hslO	heat shock protein Hsp33	SPR1C2F_v1_830071	9,6	106
Q7S_21830	glutaredoxin-family domain-	Q7S_21830	35,7	41

[1] Les gènes indiqués en vert sont les gènes sous-exprimés ($p < 0,05$)
[2] Le locus-tag SPR1C2F correspond aux gènes de la souche *S. proteamaculans* 1C2F ; CDIDSM : *C. divergens* DSM20623 ; ABWL : *C. youngae* ATCC29220 ; AOMS : *C. freundii* GTC09479 ; RPLCHB : *R. planticola* CHB ; Q7S : *R. aquatilis* Q7S ; BTH160X : *B. thermosphacta* JOUY160x8 ; SPRA44 : *S. proteamaculans* MFPA44A14-01 ; SEPLYAS9 : *S. plymuthica* AS9 ; YINY228 : *Y. kristensenii* Y228 ; SPLS13 : *S. plymuthica* S13
[3] Le facteur de sous-expression du gène entre les deux teneurs en sel

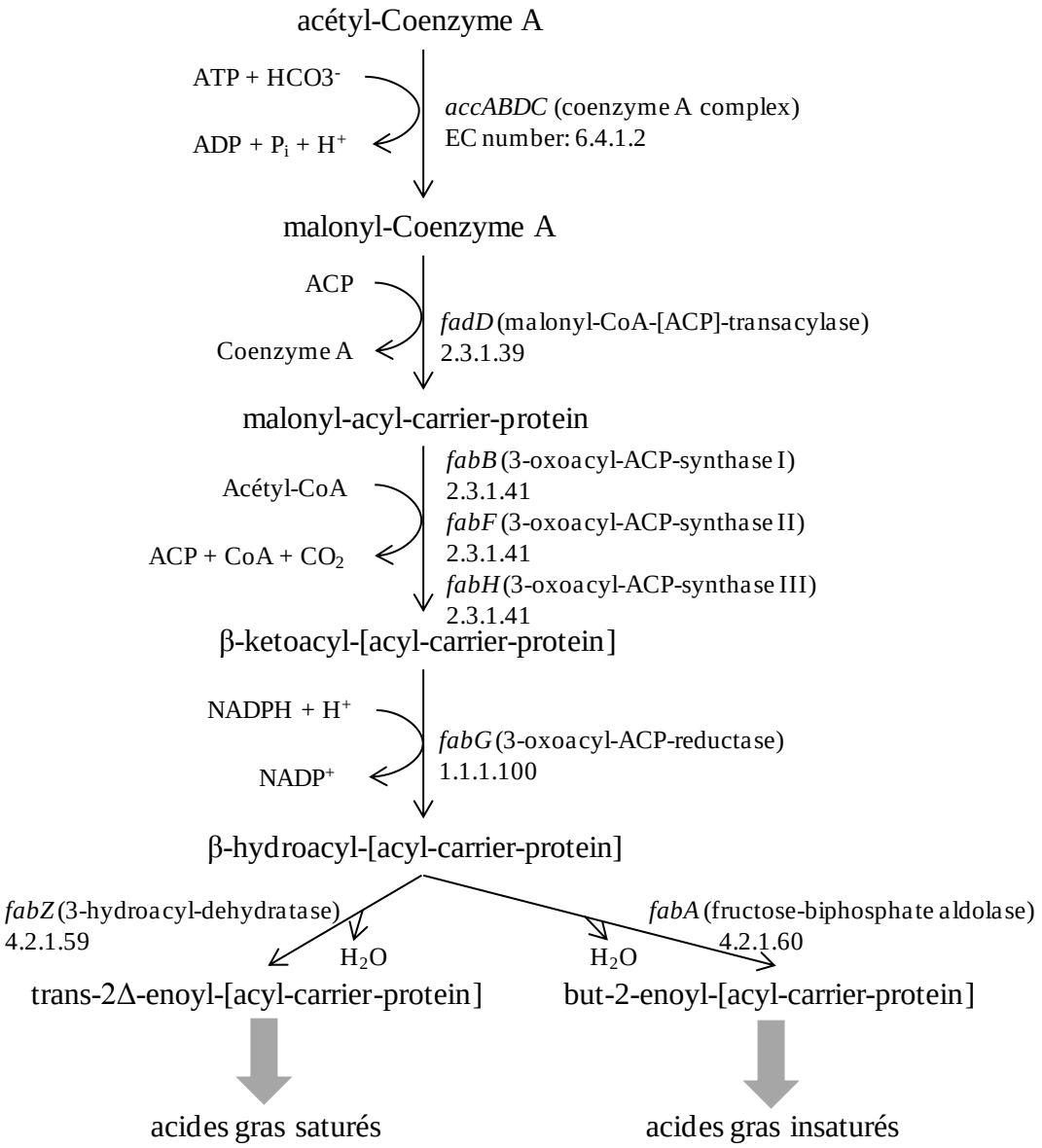
	containing protein			
SPR1C2F_v1_190055	glutathione S-transferase domain	SPR1C2F_v1_190055	23,1	33
SPR1C2F_v1_190122	putative peroxiredoxin	SPR1C2F_v1_190122	6,3	907
SPRA44_v1_140081	putative peroxiredoxin	SPRA44_v1_140081	7,7	746
tig	prolyl isomerase (trigger factor)	BTH160X_v1_50149	31,3	25
yegD	putative chaperone	SPR1C2F_v1_590043	16,2	600
		SPRA44_v1_580012	16,7	320
yegQ	putative peptidase	SPR1C2F_v1_590055	9,5	416
Biogénèse paroi cellulaire, membrane, enveloppe				
CDIDSM_v1_21721	protein	CDIDSM_v1_21721	8,9	125
CDIDSM_v1_21869	autolysin	CDIDSM_v1_21869	8,8	548
CDIDSM_v1_21969	CDP-Glycerophosphate	CDIDSM_v1_21969	23,9	43
dacA	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	SPR1C2F_v1_220085	8,7	378
dacB	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	SPR1C2F_v1_110087	10,1	187
kdsB	3-deoxy-manno-octulosonate cytidylyltransferase	SPR1C2F_v1_120060	11,6	148
kdsD	D-arabinose 5-phosphate isomerase	SPRA44_v1_740019	15,8	79
lepA	ribosomal elongation factor, GTPase	CDIDSM_v1_21188	8,6	133
prc	carboxy-terminal protease	SPR1C2F_v1_300057	9,8	529
SEPLYAS9_5005	bifunctional protein glmU	SEPLYAS9_5005	39,5	30
slyB	putative outer membrane lipoprotein	SPR1C2F_v1_310028	8,4	408
spr	putative peptidase, outer membrane lipoprotein	SPR1C2F_v1_80032	12,4	498
tolC	transport channel	SPR1C2F_v1_750072	9,4	323
		SPRA44_v1_690066	9,1	126
yfbE	uridine 5'-(beta-1-threo-pentapyranosyl-4-ulose diphosphate) aminotransferase	SPRA44_v1_290031	15,2	96
yfhD	putative transglycosylase	SPRA44_v1_590041	10,8	77
Réplication, recombinaison et réparation				
dnaN	DNA polymerase III, beta subunit	ABWL_v1_220385	37,0	82
mutM	formamidopyrimidine/5-formyluracil/ 5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase	SPR1C2F_v1_880078	10,0	156
parE	topoisomerase IV subunit B	SPR1C2F_v1_750066	7,3	414
phr	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	CDIDSM_v1_20899	9,2	74
priB	primosomal protein N	SPR1C2F_v1_110054	9,9	452
		SPRA44_v1_70052	8,1	380
Q7S_20935	transcriptional regulator HU subunit alpha	Q7S_20935	11,5	774
ruvA	component of RuvABC resolvasome, regulatory subunit	SPR1C2F_v1_400040	11,3	127
ruvB	holliday junction helicase, subunit B	SPR1C2F_v1_400039	8,5	115
SPLS13_01275	transcriptional regulator	SPLS13_01275	15,3	69

topA	DNA topoisomerase I	CDIDSM_v1_21325	11,3	149
		SPR1C2F_v1_390146	8,8	1 010
xseA	exodeoxyribonuclease VII	CDIDSM_v1_21727	16,5	66
ycbY	putative conserved AdoMet-dependent methyltransferase with RNA interaction domain	SPR1C2F_v1_120087	11,6	235
yicR	protein associated with replication fork, possible DNA repair protein	SPR1C2F_v1_880081	5,8	489
Transcription				
csp	cold shock-like protein	SPR1C2F_v1_120056	12,5	225
cspC	stress protein, member of the CspA-family	SPR1C2F_v1_490049	9,1	1 069
		SPRA44_v1_420023	8,9	851
cspE	DNA-binding transcriptional repressor	SPR1C2F_v1_120057	14,8	96
fis	global DNA-binding transcriptional dual regulator	ABWL_v1_250011	35,3	264
		SPR1C2F_v1_790026	14,4	371
nusA	transcription termination/antitermination L factor	SPR1C2F_v1_110097	7,4	827
nusG	transcription antitermination protein	ABWL_v1_390003	27,4	408
ohrR	organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator	SPR1C2F_v1_50023	9,5	165
rho	transcription termination factor	SPRA44_v1_20027	10,4	391
rnb	ribonuclease II	SPR1C2F_v1_390123	9,0	311
		SPRA44_v1_350086	13,1	184
rpoA	RNA polymerase (alpha subunit)	CDIDSM_v1_20287	10,1	290
rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Q7S_21000	9,8	1 368
SPR1C2F_v1_120094	transcriptional regulator, HxlR family	SPR1C2F_v1_120094	7,8	222
ttk	division inhibitor	SPR1C2F_v1_880086	10,6	114
uvrY	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with BarA	CBRB01_v1_23545	54,3	175
Traduction, structure et biogénèse du ribosome				
dusB	tRNA-dihydrouridine synthase B	ABWL_v1_250012	24,0	243
		SPR1C2F_v1_790025	10,2	1 215
		SPRA44_v1_750022	11,1	724
ECL_03940	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	ECL13047_03940	28,5	122
fusA	protein chain elongation factor EF-G, GTP-binding	SPR1C2F_v1_830001	8,1	1 923
gltX	glutamyl-tRNA synthetase	CDIDSM_v1_20218	8,9	176
leuS	leucyl-tRNA synthetase	SPRA44_v1_160036	8,67	256
miaA	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	Q7S_02125	14,4	94
rhlB	ATP-dependent RNA helicase	SPR1C2F_v1_60015	8,4	450
rimM	16S rRNA processing protein	SPR1C2F_v1_170130	9,1	987
rnpA	protein C5 component of RNase P	SPR1C2F_v1_890046	17,2	161
rplB	50S ribosomal protein L2	SPR1C2F_v1_820017	7,8	670

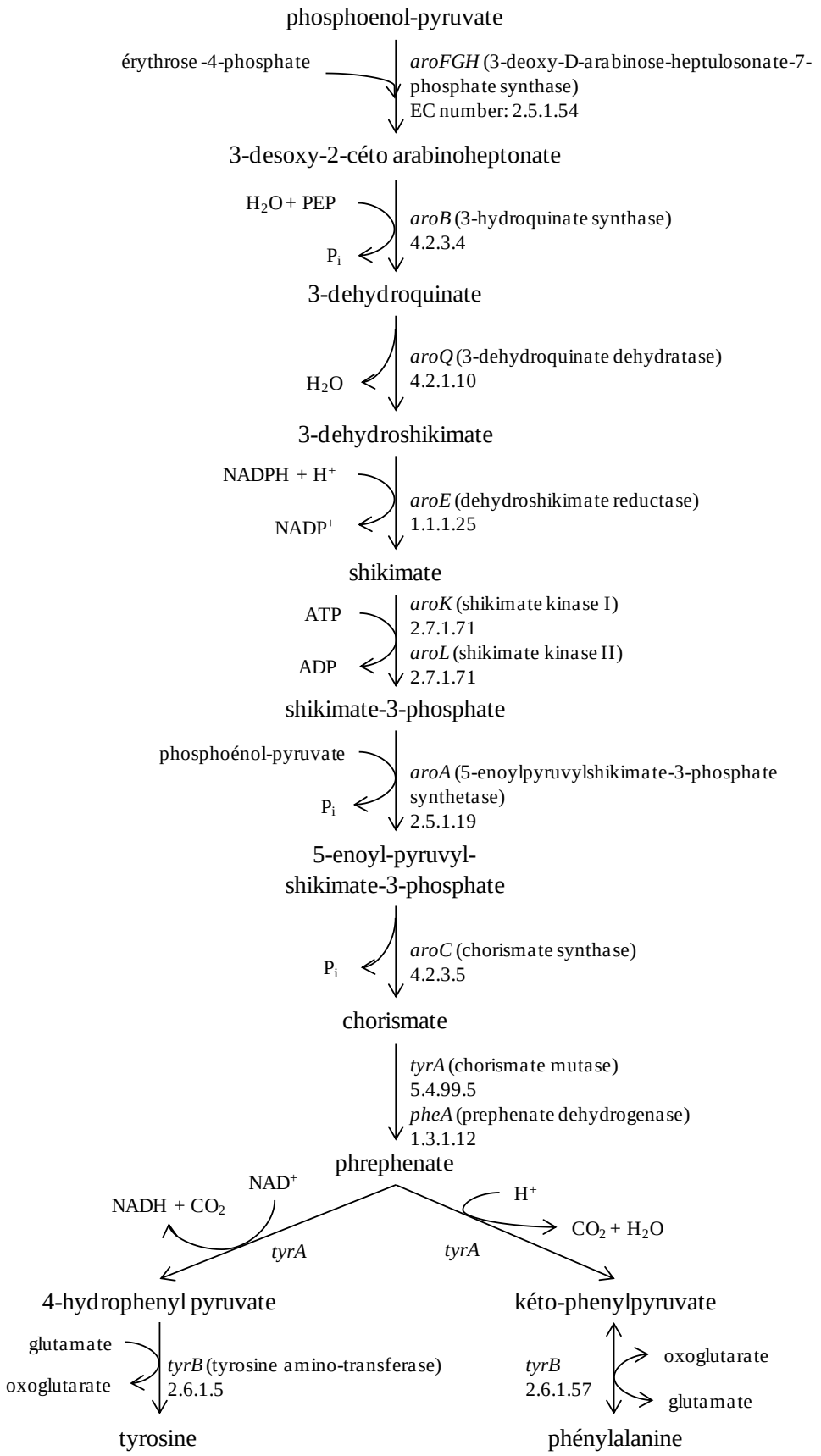
		SPRA44_v1_720037	9,1	529
rplC	50S ribosomal protein L3	SPR1C2F_v1_820022	9,7	1 362
		YINY228_v1_1495	21,5	48
rplD	ribosomal protein L4	CDIDSM_v1_20263	12,2	245
	50S ribosomal protein L4	SPRA44_v1_720039	12,8	1 274
rplE	50S ribosomal protein L5	SPRA44_v1_720029	8,5	833
rplF	50S ribosomal protein L6	SPR1C2F_v1_820002	7,9	449
rplJ	ribosomal protein L10 (BL5)	CDIDSM_v1_20238	17,5	272
rplJ	50S ribosomal subunit protein L10	SPR1C2F_v1_90013	8,6	869
rplO	50S ribosomal protein L15	SPRA44_v1_720022	8,1	423
rplX	50S ribosomal subunit protein L24	SPR1C2F_v1_820007	8,2	1 098
		SPRA44_v1_720030	8,5	671
rplY	50S ribosomal subunit protein L25	SPR1C2F_v1_80022	12,2	553
		SPRA44_v1_500021	13,5	557
rpmA	ribosomal protein L27 (BL24)	CDIDSM_v1_21565	8,5	231
rpmB	50S ribosomal protein L28	SPR1C2F_v1_880080	8,4	1 088
rpmE	50S ribosomal subunit protein L31	SPR1C2F_v1_880021	7,3	700
rpmG	50S ribosomal protein L33	SPR1C2F_v1_880079	9,3	464
rpmG	50S ribosomal protein L33	SPRA44_v1_780078	8,8	564
rpmGA	ribosomal protein L33	CDIDSM_v1_21656	12,5	167
rpsI	30S ribosomal protein S9	SPR1C2F_v1_780084	11,3	917
rpsK	30S ribosomal protein S11	SPR1C2F_v1_810022	9,1	890
		SPRA44_v1_720019	8,0	514
rpsM	ribosomal protein S13	CDIDSM_v1_20285	8,9	140
rpsP	30S ribosomal protein S16	SPRA44_v1_90196	9,6	354
rpsQ	30S ribosomal protein S17	SPRA44_v1_720032	14,3	80
rpsR	30S ribosomal protein S18	SPLS13_01640	13,7	210
		SPR1C2F_v1_110055	10,9	382
rpsT	30S ribosomal subunit protein S20	SPRA44_v1_90027	7,3	846
rpsU	30S ribosomal protein S21	SPLS13_22385	16,0	294
rsuA	16S rRNA pseudouridylate 516 synthase	SPR1C2F_v1_80024	9,9	154
SEMARFGI94_4267	SSU ribosomal protein S19P	SEMARFGI94_4267	13,6	115
SEPLYAS9_1702	asparaginyl-tRNA synthetase	SEPLYAS9_1702	15,1	65
SEPLYAS9_4406	30S ribosomal protein S21	SEPLYAS9_4406	11,9	313
SEPLYAS9_4648	30S ribosomal protein S7	SEPLYAS9_4648	10,6	241
SPLS13_23645	30S ribosomal protein S5	SPLS13_23645	16,7	124
SPR1C2F_v1_590044	GCN5-related N-acetyltransferase	SPR1C2F_v1_590044	37,5	59
SPR1C2F_v1_90002	protein chain elongation factor EF-Tu, putative GTP-binding factor (duplicate of tufA) (fragment)	SPR1C2F_v1_90002	7,1	1 165
trmA	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	SPR1C2F_v1_880003	14,8	310
trmD	tRNA (guanine-1-)-methyltransferase	SPR1C2F_v1_170131	12,1	810
tufA	elongation factor Tu	CDIDSM_v1_20258	10,1	578
yfiF	putative methyltransferase	SPR1C2F_v1_630039	13,7	593
ygjO	putative methyltransferase small domain	SPRA44_v1_670038	14,9	398
Production et conversion de l'énergie				
fldA	flavodoxin 1	SPR1C2F_v1_220124	7,9	281

glpD	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase, aerobic, FAD/NAD(P)-binding	ABWL_v1_220076	39,3	134
gor	glutathione oxidoreductase	SPR1C2F_v1_840054	8,9	714
gor	glutathione oxidoreductase	SPRA44_v1_760172	9,8	375
ndh	respiratory NADH dehydrogenase 2/cupric reductase	SPR1C2F_v1_270074	11,5	112
SEPLYAS9_4367	hypothetical protein	SEPLYAS9_4367	12,2	72
sfcA	malate dehydrogenase, (decarboxylating, NAD-requiring) (malic enzyme)	ABWL_v1_50094	42,4	95
SPR1C2F_v1_880009	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase dimerisation region	SPR1C2F_v1_880009	13,0	139

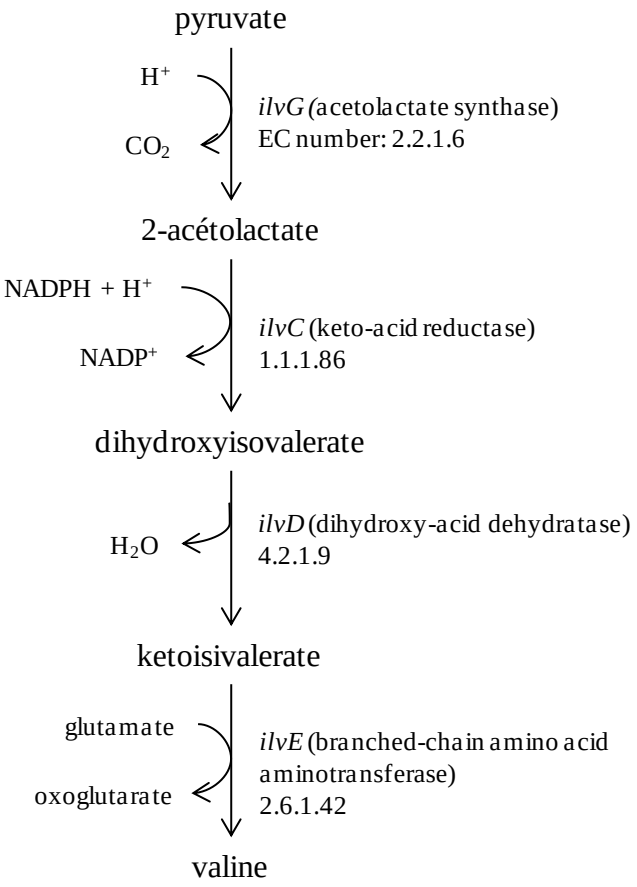
8.6. Voie de synthèse des acides gras chez *Serratia* spp.



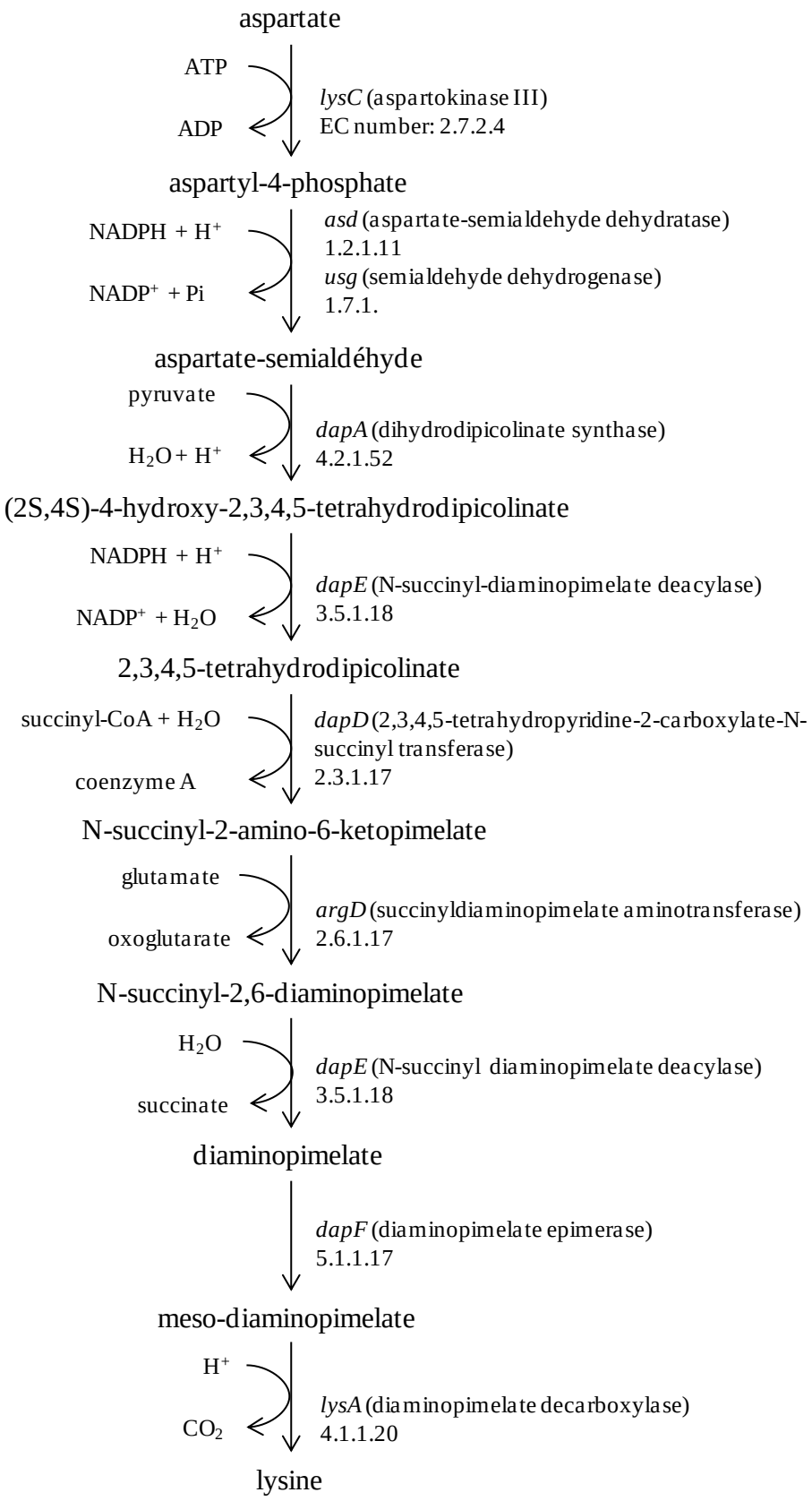
8.7. Voie de synthèse de la tyrosine et de la phénylalanine chez *Serratia* spp.



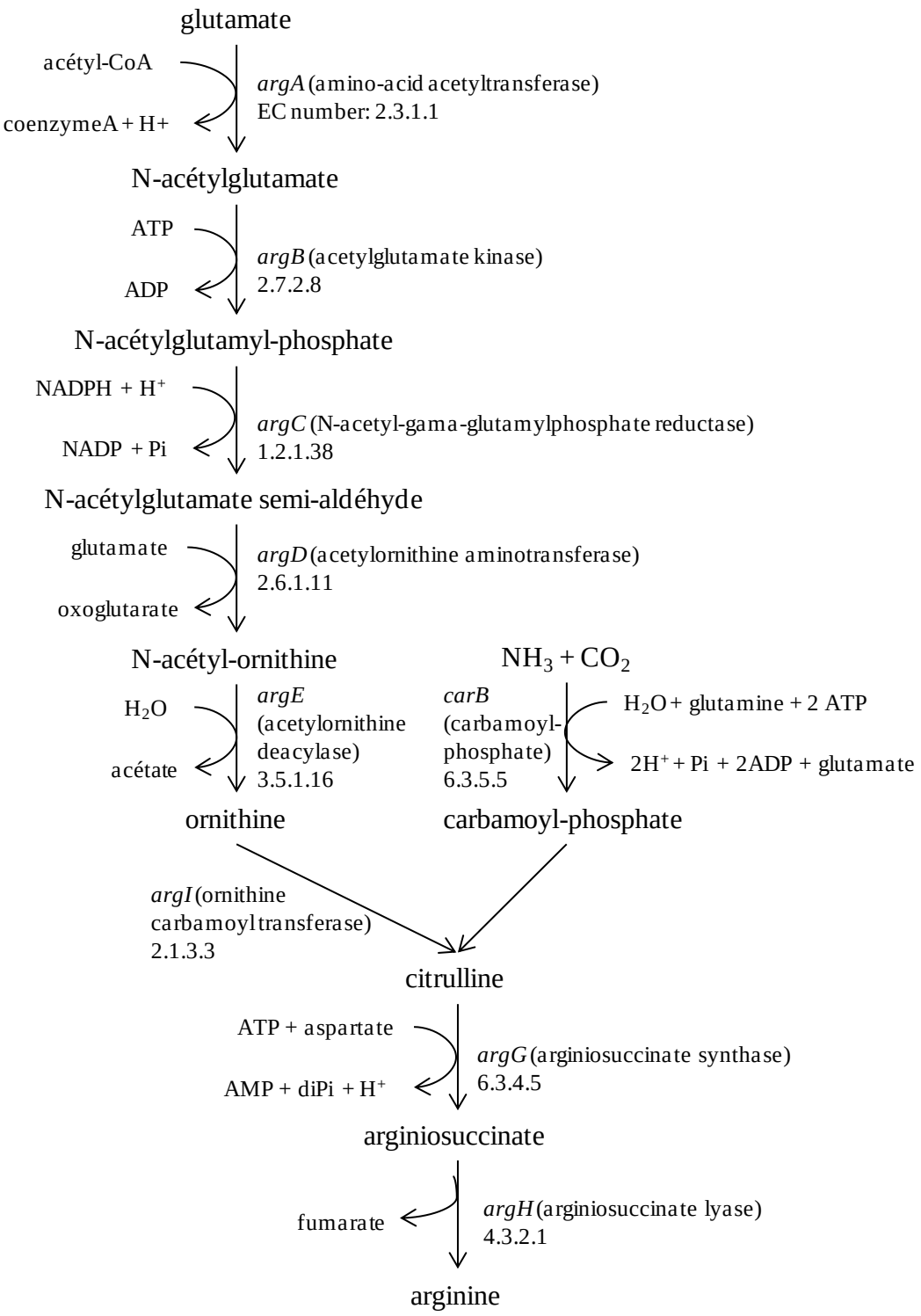
8.8. Voie de synthèse de la valine chez *Serratia* spp.



8.9. Voie de synthèse de la lysine chez *Serratia* spp.



8.10. Voie de synthèse de l'arginine et de l'ornithine chez *Serratia* spp.



Titre : Les impacts de la réduction de la teneur en sel sur la conservation et les écosystèmes bactériens des chipolatas

Mots clés : sel, altération, diversité bactérienne, activités métaboliques

Résumé : Le sel joue un rôle essentiel dans la conservation des produits de charcuterie puisqu'il inhibe le développement bactérien. Or, les recommandations nutritionnelles visent à réduire les teneurs en sel dans les denrées alimentaires. Les objectifs de ce projet de thèse étaient (1) de caractériser la communauté bactérienne des chipolatas et le phénomène d'altération sous l'effet d'une réduction de sel et (2) de corréler la dégradation organoleptique des produits aux modifications de la communauté bactérienne.
Nous avons tout d'abord caractérisé l'altération des chipolatas par des mesures sensorielles et physico-chimiques. Les travaux démontrent que l'intensité de l'altération est plus importante quand la teneur en sel est réduite et plus particulièrement lorsque les chipolatas sont conditionnées sous atmosphère modifiée. L'altération est caractérisée par la production d'odeurs soufrées, aigres et rances, une diminution du pH des chipolatas et une augmentation de la production d'exsudat.
Parallèlement, nous avons décrit la diversité bactérienne des chipolatas altérées par analyse des ARNr 16S bactériens et l'abondance des espèces bactériennes a été quantifiée par qPCR. Par ces méthodes, nous avons pu distinguer la population dominante de la population sous-dominante. La baisse de sel entraîne un déséquilibre d'abondance entre ces deux populations et ce déséquilibre résulte non pas de l'augmentation des espèces dominantes mais d'une diminution d'abondance des espèces sous-dominantes.
Pour comprendre le rôle respectif de ces populations bactériennes, nous avons analysé leurs activités métaboliques par approche RNAseq. Les travaux montrent une forte activité métabolique des espèces sous-dominantes. Lorsque le sel est en plus faible concentration, l'expression des gènes de *Serratia* spp. impliqués dans la fermentation du pyruvate pour produire de l'éthanol, du CO_2 et de l'acétate est plus importante. La production d'acétate par cette espèce bactérienne peut être reliée aux défauts d'altération observés (baisse de pH, production d'exsudat, odeur aigre).
Ces travaux démontrent que le sel impacte la communauté bactérienne des chipolatas (abondance et activités métaboliques) et que cette perturbation compromet la qualité organoleptique des produits.

Title: Impacts of reducing salt content on storage and bacterial ecosystem of raw pork sausages

Keywords: salt, spoilage, bacterial diversity, metabolic activities

Abstract: Salt content plays a key role in meat product preservation since it inhibits bacterial growth. However, dietary guidelines aim to reduce salt content in food. The objectives of this study were (1) to characterize the bacterial community of raw pork sausages and the spoilage phenomenon of these products under salt reduction conditions and (2) to correlate the organoleptic deterioration of the products to modifications in bacterial community.
We first characterized the raw pork sausages spoilage by sensory and physicochemical analysis. The work demonstrates that spoilage intensity is greater under a reduced salt content, particularly when sausages are packaged under modified atmosphere. The spoilage is characterized by the production of sulfur, sour and rancid off-odors, a decrease in pH of the sausages and an increase of exudate production.
At the same time, we described the bacterial diversity of spoiled sausages through 16S rRNA analysis. Abundance of bacterial species was quantified by qPCR. With these methods, we were able to distinguish the dominant population from the subdominant population. Reducing salt content causes an abundance imbalance between these two populations. This imbalance does not result from an increase of the dominant species; it results from a decrease in abundance of subdominant species.
To understand the roles of these bacterial populations, we analyzed their metabolic activities by RNA-Seq approach. The works highlight a high metabolic activity of the subdominant species. When the salt concentration is lowest, the expression of *Serratia* sp. genes involved in the fermentation of pyruvate to produce ethanol, CO_2 and acetate is most important. The acetate production may be connected to the spoilage defaults observed (decrease in pH, exudate production and sour off-odors).
These studies reveal that salt reduction impacts the bacterial community of raw pork sausages (abundance and metabolic activities) and this disruption compromises the organoleptic quality of the products.