



# Utilisation des microbiotes comme modèles

**Utilisation de consortia bactériens ou de microbiotes complexes comme modèles dans la compréhension des interactions microbiennes des produits carnés : avantages et limites.**

**Mots-clés :** microbiotes, matrices, bactéries, souches, modélisation

**Auteur :** Monique Zagorec<sup>1</sup>, Marie Champomier-Vergès<sup>2</sup>, Stéphane Chaillou<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Oniris, INRAE, SECALIM, UMR1014, Nantes, France

<sup>2</sup> Université Paris Saclay, AgroParisTech, INRA, Institut MICALIS, Jouy En Josas, France

**Pour comprendre les interactions microbiennes dans les aliments, des cocktails de souches peuvent être constitués à partir de cultures pures et étudiés dans des aliments modèles simplifiés. Des microbiotes complexes récoltés à partir de matrices alimentaires peuvent aussi être utilisés. Ces derniers sont des systèmes plus complexes à modéliser mais proches de la réalité et permettent des expériences reproductibles.**

## Résumé :

L'étude microbiologique des aliments est limitée par la variabilité entre lots (diversité et abondance des espèces) et la présence possible de bactéries inconnues ou non encore cultivées. On peut contourner cette limite par deux approches. L'une reconstitue des cocktails de souches à partir de cultures pures dans des aliments modèles simplifiés et permet la construction de modèles mathématiques. L'autre récolte les microbiotes naturels des aliments sans culture préalable. Dans ce cas, la modélisation est plus difficile mais les microbiotes sont reproductibles et plus proches de la réalité. La complémentarité de ces approches est discutée.

**Abstract: Use of bacterial consortia or complex microbiota as a model for understanding microbial interactions in meat products: advantages and limitations.**

The microbiological study of food is limited because of the variability between samples (species diversity and abundance) and the presence of unknown or yet non cultivated bacteria. Two approaches exist to circumvent this. One constitutes strain cocktails from pure cultures in simplified food models that enable mathematical modeling. The second collects natural food microbiota without a prior culture step. For this, modeling is more difficult but microbiota are reproducible and closer to the food reality. The complementarity of these two approaches is discussed.

## INTRODUCTION

L'utilisation des techniques de séquençage à haut débit a révolutionné notre vision de la microbiologie des aliments. La présence dans les aliments d'espèces non cultivées ou difficiles à cultiver dans les conditions standard ou même d'espèces inconnues a été mise en évidence grâce à ces techniques. Ces méthodes ont également montré que différentes souches d'une même espèce pouvaient cohabiter. Enfin, nous savons maintenant que la dynamique de ces différentes populations au cours de la conservation varie suivant les conditions de stockage (résultant d'interactions abiotiques) et de la nature des espèces partageant une même niche (résultant d'interactions biotiques). L'étude des interactions (biotiques et abiotiques) au sein de ses écosystèmes peut être abordée grâce à la construction de modèles. Une première approche expérimentale est basée sur la constitution des consortia de souches (mélanges d'une ou

de plusieurs souches appartenant à une ou plusieurs espèces) et à étudier leur comportement après inoculation sur des aliments modèles ou reconstitués. Elle permet d'appréhender des systèmes complexes en utilisant des modèles biologiques simplifiés. Une seconde approche en émergence, similaire à celle utilisée pour l'étude des microbiotes digestifs, consiste à stocker et utiliser des microbiotes tels quels pour les réinoculer sur des aliments et suivre leur comportement. Cette seconde méthode est moins simplificatrice et dépend de la résistance des microbiotes au stockage, mais présente l'avantage de pouvoir aborder, par exemple, le comportement d'espèces inconnues ou jusque-là non cultivées et tient compte de l'abondance relative naturelle des différents partenaires présents dans les microbiotes. Les avantages et limites des deux approches seront présentés à l'aide d'exemples.

## I. DE LA COMPLEXITE A LA VARIABILITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DES PRODUITS CARNES

De nombreuses études ont été menées depuis longtemps pour décrire les contaminants bactériens des produits carnés. L'apparition des nouvelles techniques de séquençage à haut débit a permis d'appréhender de manière bien plus approfondie la nature de ces contaminants révélant parfois quelques surprises. Par exemple, des espèces comme *Photobacterium phosphoreum*, *Lactococcus piscium* ou *Lactobacillus algidus*, jusque-là rarement décrites dans les produits carnés, se sont avérées présentes avec une occurrence supérieure à 80% dans des viandes de veau, porc, dinde et bœuf (Chaillou *et al.*, 2015). S'il était connu que la contamination des produits carnés était variable d'un lot à l'autre, ces méthodes ont permis de montrer aussi une très grande variabilité de la nature des contaminants et de leurs abondances relatives. Une étude portant sur la contamination

de cuisses de poulet conservées sous atmosphère protectrice a montré que la flore totale sur des échantillons du commerce, conservés à 4°C et analysés avant la fin de leur durée de vie, pouvait varier d'environ 103 UFC/g jusqu'à plus de 108 UFC/g suivant les lots (Rouger *et al.*, 2017). Dans ces échantillons, la nature et la répartition des différentes espèces bactériennes variait également avec certains lots dominés par *Brochothrix*, d'autres par *Shewanella*, et d'autres encore contenant des mélanges de *Carnobacterium*, *Klebsiella* et *Pseudomonas* (Rouger *et al.*, 2018).

Aussi, pour comprendre le comportement des contaminants bactériens lors des procédés de transformation et de conservation des produits carnés, un large échantillonnage et de très nombreuses répétitions seraient nécessaires pour obtenir des résultats fiables.

## II. DE LA NECESSITE DE CONSTRUIRE DES MODELES

Pour pallier à la nécessité de nombreuses répétitions, différentes approches ont été utilisées. La construction de consortia de souches, simplifiant des écosystèmes complexes pour étudier différents phénomènes d'écologie microbienne a été mise au point sur des produits laitiers dont la composition microbienne avait été bien décrite et pour lesquels il était facile de reconstituer une matrice lait stérile (Callon *et al.*, 2014). Mais cette approche a ouvert la voie à des essais pour des produits carnés frais, dont la composition microbienne est plus complexe. Par exemple, des cocktails de trois souches ont été testés soit en milieu de laboratoire soit sur viande hachée (Guilbaud *et al.*, 2012 ; Chaillou *et al.*, 2014). Il a ainsi été montré qu'une même souche peut se comporter différemment suivant les autres souches présentes dans le mélange. En milieu de laboratoire, il a été possible de modéliser la croissance de différentes espèces dans des mélanges complexes allant jusqu'à 11 souches différentes pour comprendre le comportement de bactéries responsables de l'altération des produits carnés (Pin et Baranyi, 1998). Les résultats ont suggéré des interactions bactériennes au sein de ces mélanges, mais le nombre de variables et d'équations nécessaires aux modèles prédictifs devenait trop important au fur et à mesure que les mélanges bactériens se complexifiaient. Plus récemment, l'utilisation de

communautés microbiennes naturelles a pu être réalisée (Rouger *et al.*, 2016). Cette approche a montré qu'un microbiote naturel, récolté à partir de découpes de volaille sans culture préalable pouvait être inoculé sur des filets de poulet rendus paucimicrobiens par rinçage à l'éthanol ou au lactate de sodium. Les microbiotes étaient capables de se développer et recouvrir la population résiduelle restant après rinçage. Ainsi, il était possible de réaliser des challenge-tests reproductibles avec des microbiotes dont la composition était connue et représentait l'ensemble des communautés bactériennes issues de viande, dans leurs proportions relatives naturelles. Nous avons utilisé cette approche dans l'article 3 de ce numéro spécial de la revue « Viandes et Produits carnés ». Il nous a permis de montrer, avec seulement deux microbiotes de jambon et deux répliques, une différence dans les comportements de ceux-ci face à différents procédés. L'approche utilisant des consortia reconstitués n'était pas possible ici puisqu'une espèce inconnue de *Vibrio*, dont nous ne possédions donc pas de souche, était dominante dans l'un des cas. En outre, étant donnée la variabilité de la charge bactérienne et de la nature des contaminants présents sur les dés de jambon, le nombre de répétitions à réaliser aurait été bien supérieur à deux.

### III. AVANTAGES ET LIMITES DES DIFFERENTES APPROCHES EXPERIMENTALES

L'approche consistant à construire un cocktail ou consortium de souches présente l'avantage certain de maîtriser la quantité de bactéries que l'on inocule sur la matrice expérimentale, qu'elle soit de type milieu de laboratoire ou modèle alimentaire. Avec des méthodes de séquençage haut débit ou de PCR quantitative, chaque souche peut être suivie et quantifiée individuellement, ce qui permet d'obtenir des données fiables et reproductibles. Cette approche est simplificatrice mais permet d'accéder à des réponses simples, utiles pour des modèles mathématiques. Dans ce type d'approche, il est aussi possible de bénéficier des connaissances approfondies en génomique des souches utilisées, ce qui facilite grandement l'interprétation fonctionnelle des réponses de l'écosystème. En revanche, elle ne peut considérer que des souches connues et cultivables en conditions de laboratoire. En outre, ce type d'approche ne considère en général que des espèces dominantes alors que l'on sait que, parfois, les espèces sous dominantes jouent un rôle important, notamment dans l'altération des produits carnés. Cette approche est très informative mais réductrice.

L'approche utilisant des microbiotes naturels est bien plus proche de la réalité. Elle utilise l'ensemble d'une communauté bactérienne, y compris des souches non cultivées, inconnues ou sous dominantes. Elle permet une bonne reproductibilité pour un même microbiote de départ et diminue les biais causés par la variabilité inhérente à la contamination des produits carnés. Il est plus aisé de réaliser des challenge-tests en inoculant en triplicat des microbiotes différents sur des matrices carnées paucimicrobiennes que de multiplier les lots pour s'assurer d'avoir un échantillonnage représentatif. Mais sa principale limite réside dans la résistance des microbiotes à la congélation et leur stabilité dans le temps. Enfin, le nombre d'expérimentations possibles est limité par le nombre d'aliquotes de microbiotes stockés. Il est en effet pratiquement impossible de collecter un nouveau microbiote identique à un autre, et il n'est pas souhaitable de les mélanger au risque de créer des microbiotes chimères qui n'existent pas dans la nature. Par ailleurs, la caractérisation métagénomique de ces microbiotes naturels reste très chronophage et source d'erreur dans l'attribution des fonctions biologiques à une espèce donnée.

### CONCLUSION

Les deux approches décrites dans cet article sont complémentaires. Les microbiotes naturels sont très utiles pour modéliser la structuration des communautés en termes de cinétiques de croissance et d'interactions (co-abondance et co-exclusion). Le recours aux communautés reconstituées du fait de la reproductibilité expérimentale de cette démarche est plus propice et certainement plus efficace pour l'étude des interactions fonctionnelles, car elle présuppose une très bonne connaissance de la génomique des espèces utilisées dans ce

cas. Elle est également l'approche de choix pour le développement de modèles prédictifs. Elle vient certainement en aval de la première stratégie pour approfondir la compréhension de la dynamique des communautés. Mais les résultats ou les hypothèses générés avec cette stratégie peuvent permettre également de revenir aux modèles naturels pour validation, une fois que l'interaction est caractérisée. Il est nécessaire de faire des allers-retours entre les deux.

### Références bibliographique :

- Callon C., Retureau E., Didiene R., Montel M.C. (2014). Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 98–109.
- Chaillou S., Chaulot-Talmon A., Caekebeke, H., Cardinal M., Christieans S., Denis C., Desmots M.H., Dousset X., Feurer C., Hamon E., Joffraud J.J., La Carbona S., Leroi F., Leroy S., Lorre S., Macé S., Pilet M.F., Prévost H., Rivollier M., Roux D., Talon R., Zagorec M., Champomier-Vergès M.C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal*, 9, 1105–1118.
- Chaillou S., Christieans S., Rivollier M., Lucquin I., Champomier-Vergès M.C., Zagorec M. (2014). Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science*, 97, 332–338.
- Guilbaud M., Zagorec M., Chaillou S., Champomier-Vergès M. C. (2012). Intraspecies diversity of *Lactobacillus sakei* response to oxidative stress and variability of strain performance in mixed strains challenges. *Food Microbiology*, 29, 197-204.
- Pin C., Baranyi J. (1998). Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 59–72.
- Rouger A., Remenant B., Prévost H., Zagorec M. (2016). A method to isolate bacterial communities and characterize ecosystems from food products: Validation and utilization in as a reproducible chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 38-47.
- Rouger A., Moriceau N., Prévost H., Remenant B., Zagorec M. (2018). Diversity of bacterial communities in French chicken cuts stored under modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*, 70, 7-16.