

Caractérisation de l'influence de facteurs environnementaux sur l'écologie microbienne du jambon cuit tranché.

Marine Zagdoun

▶ **To cite this version:**

Marine Zagdoun. Caractérisation de l'influence de facteurs environnementaux sur l'écologie microbienne du jambon cuit tranché.. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASA003 . tel-03270836

HAL Id: tel-03270836
https://pastel.hal.science/tel-03270836

Submitted on 25 Jun 2021

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.

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASA003

université PARIS-SACLAY

Caractérisation de l'influence de facteurs environnementaux sur l'écologie microbienne du jambon cuit tranché

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°581, Agriculture Alimentation Biologie Environnement Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France
AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 27 février 2020, par

Marine ZAGDOUN

Composition du Jury

Henry-Eric SPINNLER Professeur, AgroParisTech (Unité SayFood)	Président
Céline DELBES Chargée de recherche (HDR), INRAE (Unité de Recherche sur le Fromage)	Rapporteur & Examinatrice
Monique ZAGOREC Directrice de recherche, INRAE (Unité Secalim)	Rapporteur & Examinatrice
Jean-Pierre GUYOT Directeur de recherche, IRD (Unité Nutripass)	Examinateur
Stéphane CHAILLOU Directeur de recherche, INRAE (Unité Micalis)	Directeur de thèse
Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGES Directrice de recherche, INRAE (Unité Micalis)	Co-directrice de thèse

« Un pessimiste fait de ses occasions des difficultés, un optimiste fait de ses difficultés des occasions » - Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Me voilà au terme de ces trois ans et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce que je mène à bien ce projet.

Je souhaite tout d'abord remercier l'ANRT pour avoir participé au financement de ma thèse.

Je remercie Céline Delbès, Monique Zagorec, Henry-Eric Spinnler et Jean-Pierre Guyot d'avoir accepté de faire partie de mon jury. De même, je remercie les membres de mon comité Christophe N'Guyen Thé, Patrick Lucas et Simon Labarthe pour leurs remarques constructives sur mes travaux.

Mes remerciements vont bien sûr à mes encadrants, Stéphane Chaillou et Marie-Christine Champomier-Vergès. Vous m'avez accompagnée au long de cette thèse, tout en me laissant prendre mon autonomie. Stéphane, merci pour ta patience, tes encouragements et tes remarques constructives. Tu as su me faire réfléchir avec humour et pédagogie et nos discussions scientifiques m'ont beaucoup apporté. Marie, merci pour ta disponibilité et ton soutien tout au long de ma thèse et particulièrement durant cette phase intense que représente la rédaction. Merci pour ton exigence et ta rigueur scientifique, au travers desquelles j'ai beaucoup appris. Tu as su égayer mes soirées de rédaction avec tes citations d'illustres auteurs tels que Nufnuf ou Spider cochon.

Je remercie également les autres membres qui font ou ont fait partie de l'équipe durant ma thèse : Gwendoline Coeuret, Simon Poirier, Caroline Kothe et Pierre Renault. Gwendoline, souriante et prête à partager tes connaissances et tes astuces, tu as été un vrai soutien. Merci pour ton aide, ta bonne humeur et la relecture de mon manuscrit. Merci d'être toujours motivée pour une petite course des princesses dans les jardins de Versailles, pour aller à la gym ou pour organiser un repas crêpes (oui, après l'effort, le réconfort) ! Tu es une super co-bureau, ne change pas ! Je n'oublie pas non plus Simon, mon deuxième compagnon de bureau pendant une grande partie de ma thèse. Merci pour tes conseils, tes relectures attentives de mes travaux et tes petites blagues à mes retours de vacances! Je te souhaite plein de bonheur à Lausanne. Caroline, merci pour tes messages

d'encouragements, ponctués de petits gâteaux brésiliens. Courage pour la dernière année! Pierre, merci pour tes remarques constructives qui m'ont permis de mieux mettre en valeur mon travail.

Méry N'dione, merci pour ton travail de stage rigoureux et ta motivation. Je te souhaite une excellente thèse à la Rochelle. Je remercie également Cécile Neuvéglise d'avoir partagé avec moi ses protocoles expérimentaux et son expertise sur les levures.

Merci à tous mes collègues en entreprise pour leur accueil chaleureux, pour avoir pris le temps de partager leur savoir-faire et pour avoir précautionneusement mené les essais en production.

Je remercie mes collègues du bâtiment 526 pour nos conversations aux pauses café, et leur soutien durant cette phase de rédaction.

Merci Abarna, Allison, Louise, Célia, Sébastian, Elliot, Sami, Renaud, Natalia, Léa, Pauline, Cécile, Macarena et tous les amis des autres équipes que j'ai pu oublier. Abarna, merci encore pour toutes tes petites attentions et pour m'avoir apporté ma dose de papillotes journalière <3.

Merci à mes amis géniaux qui ont toujours été présents. Une dédicace toute particulière à mes amies co-thésardes à distance, Marie et Juliana, qui ont vécu les mêmes étapes de thèse que moi à quelques mois d'intervalle et qui m'ont toujours soutenue et fait rire avec leurs anecdotes de labo.

A ma famille et en particulier à mes parents et ma sœur qui ont toujours cru en moi et m'ont encouragée à distance, un grand merci. J'ai de la chance de vous avoir et ces quelques lignes ne suffiront pas à dire à quel point je vous aime ! Merci pour les longues conversations au téléphone où vous vous assuriez que mon alimentation ne soit pas exclusivement chocolatée, ou encore pour avoir patiemment attendu que je termine la rédaction pour revenir passer un week-end en Franche-Comté.

Mes derniers remerciements vont à mon Pierre. Tu as été d'un soutien inconditionnel tout au long de ces trois ans. Tu m'as suivie pour cette aventure parisienne, tu m'as poussée à donner le meilleur de moi-même, tu as effacé mes doutes lors des moments de difficulté et tu as même franchi le seuil de

la cuisine pour me mijoter des petits plats réconfortants pendant la rédaction (si ça, ce n'est par une belle preuve d'amour !). Merci d'être toujours là pour moi.

Liste des abréviations

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATP : Adénosine triphosphate
BHI : Brain Heart Infusion
a_w : activité de l'eau
CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer
DGGE : Denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)
DLC : Date Limite de Consommation
EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
FICT : Fédération des Industries Charcutières et Traiteurs
GC-MS : Gas-Chromatography Mass-Spectrometry (chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse)
Gène *SSU* rRNA : gène codant pour la sous-unité de l'ARNr 16S
HACCP : Hazard Analysis of Critical Control Points
INCa : Institut National du Cancer
ITS2 : Internal Transcribed Spacer 2
MRS : de Man, Rogosa et Sharpe
pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
RDP : Ribosomal Database Project
T_0 : temps de stockage de 0 jour
T_s : temps de stockage jusqu'à altération du produit
T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de longueur de fragments terminaux)
ufc: Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1 : Processus de fabrication du jambon de l'abattage au produit fini. 21
Figure 2 : Lien entre les formes de la myoglobine du musde et la couleur des jambons. 23
Figure 3 : Contribution des produits carnés à l'apport journalier en sel et en nitrite. 25
Figure 4 : Gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S présentant des régions variables et des régions conservées.....33
Figure 5 : Nombre de copies du gène SSU rRNA au sein de différentes familles bactériennes présentes dans les produits carnés. 35
Figure 6 : Arbre phylogénétique non enraciné produit à l'aide d'un algorithme « neighbour-joining » illustrant le pouvoir de discrimination du gène gyrB au seuil de l'espèce et intra-espèces par rapport au gène SSU rRNA. 37
Figure 7 : Exemple de calcul de distance UniFrac entre deux communautés A et B. 39
Figure 8 : Diagramme de Venn montrant les genres bactériens communs ou non aux échantillons de viande (porc et bœuf confondus) et aux environnements de production (mains des employés, couteaux, surfaces de travail) dans des abattoirs de grande et de petite distribution. 43
Figure 9 : PCoA montrant l'importance des différentes étapes de transformation dans l'établissement des communautés microbiennes du Chorizo de León. 44
Figure 10 : Abondance relative des bactéries du genre Leuconostoc, Yersinia et Brochothrix sur la matière première, les plans de travail et les saucisses cuites.....48
Figure 11 : Heatmap montrant l'abondance relative d'OTUs dans des échantillons frais (T_0). 52
Figure 12 : Illustration schématique de l'effet sélectif des différentes technologies de barrière sur les bactéries du jambon cuit. 53
Figure 13 : Synthèse des différents métabolites d'altération détectés dans la viande crue stockée sous vide ou à l'air libre. 66
Figure 14 : Voies métaboliques homofermentaire et hétérofermentaire de fermentation du glucose chez les bactéries lactiques.....71
Figure 15: Ham sampling strategy. 88
Figure 16: Ward unsupervised clustering of the microbiota of cooked ham samples according to Bray-Curtis dissimilarity index. 90
Figure 17: Non-metric multi-dimensional scaling analysis of cooked ham microbiotas based on Bray-Curtis dissimilarity index. 91
Figure 18: Species composition plots of cooked ham microbiota separated by slicing line and sampling campaign.....92
Figure 19: Comparative analysis of the relative abundance of S. proteamaculans and C. divergens in cooked ham samples as a function of processing parameters. 93
Figure 20: Heatmap depicting the effect of cooking on bacterial species abundances in ham.....95
Figure 21: Correlation plot representing the Pearson coefficient between the production of end-products from the mixed-acid fermentation of pyruvate and the estimated load of bacterial species on cooked ham at the UBD. 98
Figure 22: Box plots depicting the effect of the slicing line and O_2 packaging permeability on the production (in mg/g) of end-products at the UBD. 99
Figure 23 : Constitution d'une communauté bactérienne synthétique pour inoculation sur un milieu de porc gélosé stérile. 112
Figure 24 : Bilan de l'identification des isolats étudiés 116
Figure 25: Experimental set up according to a central composite design with three factors. 129

Figure 26: Response surface modeling of total bacterial load in log10 cfu/g according to the three factors studied. 132
Figure 27: Discriminant analysis of ham-like samples using principal component analysis and the population level of each individual species within the synthetic community. 133
Figure 28: Response surface modeling of species levels of population within the synthetic community. 135
Figure 29: Response surface modeling of pH decrease and pyruvate-derived metabolic productions. 137
Figure 30 : Plan d'expériences selon un plan composite centré à deux facteurs. 146
Figure 31 : Organisation de l'échantillonnage pour répondre aux contraintes de production. 146
Figure 32 : Clustering Ward non supervisé des échantillons de jambons en fonction de leur indice de dissimilarité de Bray-Curtis et comparaison du point de référence avec les échantillons des campagnes précédentes. 152
Figure 33 : Abondance relative des espèces dans les échantillons issus des lignes de tranchage A et B à différentes concentrations en sel et en nitrite. 153
Figure 34 : Modélisation des niveaux de population au sein des communautés bactériennes des échantillons de la ligne A et de la ligne B en fonction des concentrations en sel et en nitrite. 154
Figure 35 : Modélisation de la croissance des bactéries et levures cultivables dans les échantillons issus des deux lignes de tranchage. 155
Figure 36 : Modélisation des écarts de pH entre T0 et DLC et de la production de métabolites issus de la fermentation du pyruvate dans les échantillons en fonction des concentrations en sel et en nitrite. 157
Figure 37 : Analyse en Composante Principale des échantillons aux différentes concentrations en sel et en nitrite sur la base d'indicateurs d'altération. 158

Liste des tables

Table 1 : Critères microbiologiques applicables au jambon cuit.....29
Table 2 : Activité de l'eau minimale pour la croissance de micro-organismes d'origine alimentaire. ..57
Table 3 : Niveaux de population de groupes bactériens en fonction des concentrations en sel dans différents produits carnés.....59
Table 4 : Niveaux de population de groupes bactériens en fonction des concentrations en nitrate/nitrite dans différents produits carnés. 62
Table 5 : Levels of the different processing steps.....79
Table 6 : Comparative table showing the number of species (after merging OTUs with similar taxonomic assignments) identified in different subsets of samples.....89
Table 7: Dénombrements de levures (log10 cfu/g) dans des échantillons prélevés après 15 jours de stockage abusif. 109
Table 8 : Tableau comparatif indiquant le nombre d'isolats par campagne d'échantillonnage et par ligne de tranchage.....117
Table 9 : Pourcentage des différentes espèces de levures dans les échantillons présentant au moins 2 log_{10} ufc/g. 156

Communications de mes travaux

SOUMISSION/PROJET DE PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES

Marine Zagdoun, Gwendoline Coeuret, Méry N'Dione, Marie-Christine Champomier-Vergès, Stéphane Chaillou, 2020. *Large microbiota survey reveals how the microbial ecology of cooked ham is shaped by different processing steps. Food Microbiology*, https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103547

Marine Zagdoun, Méry N'Dione, Gwendoline Coeuret, Marie-Christine Champomier-Vergès, Stéphane Chaillou. *Towards an understanding of ham ecosystem behavior to salt and nitrite reduction using a synthetic ecology approach.* Projet de soumission dans la revue *PLOS One*.

COMMUNICATIONS ORALES

Marine Zagdoun, Méry N'dione, Gwendoline Coeuret, Marie-Christine Champomier-Vergès, Stéphane Chaillou. *How can the different characteristics of an industrial production chain influence the microbial fingerprint of cooked ham?* Journée des doctorants de l'unité Micalis, 15 juin 2018, Jouy-en-Josas, France.

Marine Zagdoun, Méry N'dione, Gwendoline Coeuret, Marie-Christine Champomier-Vergès, Stéphane Chaillou. *Study of the adaptation of a ham bacterial community to salt and nitrite reduction using a synthetic ecology approach*. Congrès international *Microbial Diversity*, 27 Septembre 2019, Catane, Italie.

COMMUNICATION SOUS FORME DE POSTER

Marine Zagdoun, Méry N'dione, Gwendoline Coeuret, Marie-Christine Champomier-Vergès, Stéphane Chaillou. *How can the different characteristics of an industrial production chain influence the microbial fingerprint of cooked ham?* Congrès international *Food Microbiology*, 3 - 6 Septembre 2018, Berlin, Allemagne.

Table des matières

1 Etat de l'art 19
1.1 Le jambon, un produit périssable 19
1.1.1 Pertes de viande, impact économique et environnemental 19
1.1.2 Les standards du produit 20
1.1.3 Vers une réduction du sel et du nitrite dans le jambon 25
1.1.4 Modifications sensorielles induisant un refus des consommateurs 28
1.2 Les communautés bactériennes dans les produits carnés et plus particulièrement dans le jambon 30
1.2.1 La notion de diversité bactérienne 30
1.2.2 Sources de contaminations possibles au cours des étapes de production 40
1.2.3 Evolution des communautés pendant le stockage 50
1.2.4 Les bactéries présentes à DLC ou à l'altération correspondent à la fraction ayant résisté aux technologies de barrière 52
1.3 Communautés bactériennes et altération des produits carnés 64
1.3.1 Recherche de corrélations entre la prévalence de taxons donnés et l'altération de produits carnés 65
1.3.2 Complexité à établir un lien de causalité sur la base de ces corrélations 68
1.3.3 Etude des potentialités métaboliques des bactéries 70
2 Caractérisation des communautés microbiennes de jambons issus d'une chaîne de production industrielle 74
2.1 Contexte et objectif 74
2.2 Large microbiota survey reveals how the microbial ecology of cooked ham is shaped by different processing steps 75
2.3 Résultats complémentaires 109
2.4 Points à retenir 110
3 Impact d'une réduction de sel et de nitrite sur le comportement d'un écosystème de jambon simplifié 112
3.1 Contexte et objectif 112
3.2 Constitution d'une banque de souches isolées de jambons 115
3.3 Towards an understanding of ham ecosystem behavior to salt and nitrite reduction using a synthetic ecology approach 118
3.4 Points à retenir 142
4 Impact d'une réduction de sel et de nitrite sur le comportement des communautés microbiennes de jambons industriels 144
4.1 Contexte et objectif 144

4.2 Matériels et méthodes 145
4.3 Résultats 150
4.4 Discussion 159
5 Discussion générale et perspectives 165

PRESENTATION DE MON TRAVAIL DE THESE

Présentation de mon travail de thèse

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE au sein de l'équipe *Food Microbial Ecology* de MICALIS (INRA de Jouy-en-Josas), en collaboration avec un industriel français producteur de jambon. Il a contribué à caractériser la diversité des communautés microbiennes dans le jambon cuit issu d'une chaîne de production de cet industriel, à déterminer leur variabilité et à acquérir des connaissances sur leur comportement en fonction de leur environnement de production dans un contexte de réduction du chlorure de sodium et du nitrite de sodium.

En industrie agroalimentaire, assurer la sécurité sanitaire est un besoin primordial. La matière première, tout comme les étapes et les conditions de production peuvent être des sources de contamination bactérienne du produit et peuvent ainsi conditionner sa qualité microbiologique. Au cours du stockage, les bactéries présentes sur le produit interagissent entre elles et avec la matrice alimentaire et se structurent en communautés. Leur croissance conduit à la production de métabolites d'altération, et détermine la durée de conservation du produit qui correspond à la mention légale de DLC (Date limite de consommation) indiquée sur les produits finis.

Actuellement, un moyen d'assurer la conservation du jambon cuit est l'incorporation de chlorure de sodium (sel) et de nitrite de sodium (nitrite). Le sel est un ingrédient utilisé pour son effet bactériostatique, de même que le nitrite (agissant notamment en inhibant les bactéries pathogènes ou d'altération). Par ailleurs, ces deux composés influencent aussi les propriétés sensorielles du jambon comme la saveur et le sel est également utilisé pour ses qualités technologiques de liant et le nitrite pour stabiliser la couleur. Or, une surconsommation de sel peut augmenter les risques d'hypertension artérielle et une surconsommation de nitrite peut induire la formation de dérivés N-nitrosés potentiellement cancérogènes chez l'homme. Réduire le sel et le nitrite dans le jambon cuit est donc un enjeu à la fois sanitaire et technologique pour les industriels, visant à satisfaire les recommandations en matière de santé publique. Cependant, une réduction de sel et de nitrite est

susceptible de modifier le développement de micro-organismes indésirables, de réduire la durée de vie du produit ou encore de réduire l'acceptabilité par les consommateurs du fait de modifications sensorielles. C'est pourquoi il est indispensable d'accompagner cette réduction d'un pilotage maîtrisé du procédé de production pour une meilleure gestion du danger microbiologique.

En pratique, bien qu'ils soient produits selon un procédé standardisé, il arrive parfois accidentellement que certains jambons présentent des défauts de conservation avant la DLC. Ces défauts peuvent être de différentes formes (apparition de colonies, acidification, odeur soufrée, rance ou aigre etc.) et sont plus marqués sur les produits à teneur en sel réduite ou sans nitrite. Il est également à noter que ces produits ont une DLC réduite comparée aux produits de type standard. Il est vraisemblable que ces différences d'altération résultent d'activités de communautés microbiennes diverses pouvant être impactées par une réduction de sel et de nitrite. Pour comprendre ce phénomène, la connaissance des communautés microbiennes du jambon cuit et de leurs productions métaboliques est requise. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les communautés bactériennes dans le jambon cuit au sein de l'usine de production de l'industriel partenaire du projet et comment sont-elles impactées par la matière première et les conditions de production?
- Peut-on prévoir leur évolution dans le cadre d'une réduction de sel et de nitrite ?

Les objectifs de ma thèse étaient donc i) de caractériser les communautés bactériennes du jambon cuit au sein d'une chaîne de production unique ainsi que leurs productions de métabolites d'altération en prenant en compte les variations du procédé de production ; ii) de modéliser l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur la structure et la production de métabolites d'altération de ces communautés.

Pour identifier des corrélations entre la présence d'espèces et la production de métabolites d'altération, il est nécessaire de disposer d'un panel d'échantillons représentatif des différentes communautés microbiennes rencontrées et suffisamment large pour permettre une bonne robustesse statistique. Comme toute usine possède potentiellement un environnement microbien spécifique, notre stratégie a été d'effectuer un échantillonnage de grande ampleur pour capter la variabilité des communautés bactériennes du produit fini au sein d'une chaîne de production. Dans une première partie, nous avons testé différentes conditions en faisant varier des paramètres de production (naturellement variables au cours de l'année dans l'usine étudiée) pour déterminer leur influence sur la structure des communautés du jambon sur une durée de six mois (4 campagnes d'échantillonnage). La diversité bactérienne a été caractérisée à l'aide d'une approche globale de métagénétique, combinée à une quantification de métabolites d'altération par dosages enzymatiques. Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur le comportement de ces communautés. Afin de tester les bornes du domaine d'étude et de nous affranchir de l'influence d'autres facteurs que la concentration en sel et en nitrite que nous souhaitions faire varier, nous avons d'abord mis en place une stratégie d'écologie microbienne synthétique utilisant une communauté bactérienne reconstituée (mimant les communautés naturelles du jambon) et un milieu synthétique de jambon à différentes concentrations en sel et en nitrite. Nous avons ensuite observé les comportements microbiens des communautés sur de vrais jambons à différentes concentrations en sel et en nitrite.

Ce manuscrit est structuré en cinq chapitres.

Le chapitre 1 est un état de l'art des connaissances relatives aux communautés bactériennes présentes dans la viande. Les sources potentielles de leur variabilité ont été recensées, ainsi que les métabolites qu'elles produisent. Enfin, cet état de l'art rassemble ce qui est connu dans la littérature concernant l'effet d'une réduction de sel et de nitrite sur la structure et l'activité des communautés microbiennes dans les produits carnés.

Le chapitre 2 de nos résultats présente comment l'écologie microbienne du jambon cuit est façonnée par les différentes étapes du procédé de production. Ces résultats ont donné lieu à un manuscrit accepté dans le journal *Food Microbiology*.

Le chapitre 3 de nos résultats décrit en quoi une réduction de sel et de nitrite impacte le comportement d'un écosystème reconstitué sur milieu de jambon synthétique. Ce travail est présenté sous la forme d'un article non soumis.

Le chapitre 4 de nos résultats porte sur la caractérisation du comportement des communautés naturelles sur de vrais jambons à différentes concentrations en sel et en nitrite.

Enfin, le chapitre 5 constitue une discussion générale, à la fois sur les contributions de ce travail pour la communauté scientifique mais également sur les perspectives qu'il ouvre en milieu industriel.

ETAT DE L'ART

1 ETAT DE L'ART

1.1 LE JAMBON, UN PRODUIT PERISSABLE

1.1.1 Pertes de viande, impact économique et environnemental

Avec une production annuelle de 2,2 millions de tonnes équivalent carcasse (FranceAgriMer, 2019), la France est le troisième pays européen producteur de viande de porc, derrière l'Espagne et l'Allemagne. Cette production est centralisée majoritairement dans le Grand Ouest de la France. Au niveau national, la viande de porc est consommée à 25 % en frais et à 70 % sous forme de viande transformée, principalement en produits de charcuterie (FranceAgriMer, 2019). Le jambon cuit représente à lui seul 21 % de la production de charcuterie. Sur l'année 2018, une production de 235 598 tonnes a été recensée, soit un chiffre d'affaire de 1,6 milliard d'euros (FICT et Ministère de l'Agriculture, 2018). Ce produit a donc une importance économique majeure dans la filière porc. Or, bien que cuit et saumuré avec du sel et du nitrite (ce qui permet un allongement de sa conservation en comparaison avec les viandes non transformées), il reste sensible à l'altération. Il est plus fragile du point de vue microbiologique que le jambon sec du fait de son activité de l'eau a_w élevée (a_w : 0,98-0,99 dans le jambon cuit contre 0,91-0,95 pour le jambon sec).

Les pertes annuelles spécifiques au jambon ne sont pas recensées dans la littérature, mais plus globalement, à différents niveaux de la chaîne alimentaire, une part importante des produits issus des filières porc et bœuf est perdue. Selon l'ADEME, ces deux filières présentent des niveaux de pertes similaires (ADEME, 2016). Les étapes de production et de transformation totalisent respectivement 1 % et 1,3 % des pertes de la production totale hors rendement carcasse, tandis que les étapes de distribution et de consommation en totalisent respectivement 3,4 % et 5 %. L'altération de la viande alourdit les pertes au niveau de la distribution et de la consommation. En moyenne, les pertes cumulées sont estimées à 10 % en masse, soit un manque à gagner de 2,3 milliards d'euros et un impact environnemental de 4 765 000 tonnes de CO_2 équivalent carbone.

Pour déterminer quels sont les critères d'altération d'un jambon, nous devons tout d'abord connaître les critères sensoriels attendus pour ce produit. Certaines étapes de la production sont clés dans l'établissement de ces critères.

1.1.2 Les standards du produit

1.1.2.1 Une production standardisée

La fabrication du jambon est un processus standardisé incluant de nombreuses étapes de production. Nous en avons synthétisé les principales étapes dans la Figure 1. Les porcs sont abattus par étourdissement et saignée, puis trempés dans de l'eau à 62 °C pour faciliter le retrait de la peau. Les pieds sont également retirés. Le porc est ensuite éviscéré, puis rincé pour éliminer les résidus de découpe. Enfin, après refroidissement, les muscles sont découpés puis transportés dans des camions réfrigérés jusqu'à l'usine de production où ils sont parés. Le jambon est produit à partir des muscles des membres postérieurs. Les muscles sont saumurés pour l'essentiel avec un mélange d'eau, d'antioxydants (E300, E301,E315, E316), de sucre (saccharose ou dextrose), de sel fin, de sel nitrité et éventuellement d'une aromatisation à base de bouillons, épices, aromates et/ou arômes. Les muscles sont ensuite barattés pour faciliter l'incorporation de la saumure dans la viande. En sortie de barattage, ils sont moulés en pains de viande pour une cuisson pouvant varier entre 66 et 70°C à cœur selon les barèmes de cuisson. Enfin, le jambon est stocké pour qu'il soit consistant avant tranchage et emballage.

Tout au long de ces étapes, l'identification et la maîtrise des risques microbiologiques sont essentielles. Pour cela, les entreprises emploient la méthode HACCP (*Hazard Analysis of Critical Control Points*). Il est ainsi préconisé de sélectionner les matières premières sur les plans technologique et microbiologique et de respecter les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication. Ces pratiques doivent être maintenues tout au long de la production et particulièrement après cuisson, dans la mesure où il n'y a plus d'étape d'élimination bactérienne après ce point. Ainsi en

production industrielle, le retrait des moules de cuisson, le tranchage et l'emballage s'effectuent le plus souvent en salle blanche. Dans ces salles, dont la température est généralement régulée entre 4 et 6°C, l'air est filtré et en surpression.

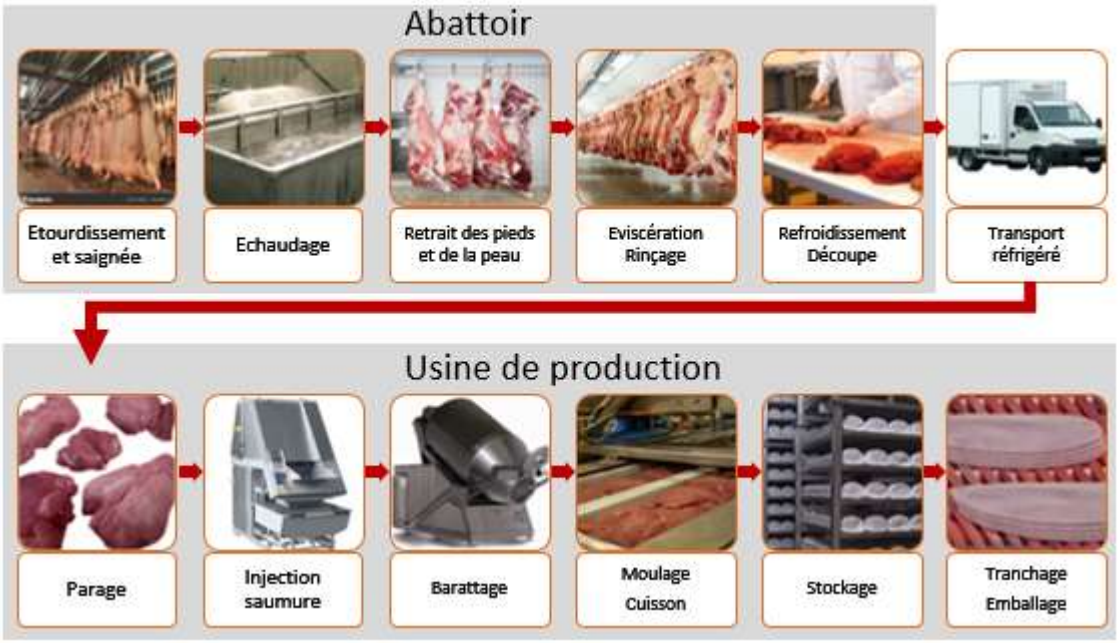


Figure 1 : Processus de fabrication du jambon de l'abattage au produit fini.

1.1.2.2 Caractéristiques sensorielles attendues

Ce procédé de fabrication permet la production de jambons répondant à des critères sensoriels précis. Comme défini par le Code des Usages de la Charcuterie, le produit doit se présenter « sous forme de bloc à trancher ou de tranches de **tenue suffisante**, de **couleur rose** » et doit avoir un **goût caractéristique** des produits de la charcuterie (FICT, 2016).

La bonne tenue du jambon est permise par l'ajout de sel (NaCl) au cours du saumurage. La texture du jambon est caractérisée par le pourcentage en eau et l'agglutination des muscles entre eux. Une viande fraîche contient initialement environ 75 % d'eau, mais sous l'effet d'une contrainte thermique une partie de cette eau est libérée. Il a été montré que la masse d'eau perdue au cours de la cuisson des jambons était deux fois plus importante à 1,2 % qu'à 2 % de sel (Pietrasik et Gaudette, 2015).

Ainsi, l'ajout de sel avant cuisson augmente le pouvoir de rétention d'eau de la viande. Le sel facilite également la solubilisation de protéines myofibrillaires comme l'actine et la myosine (Macfarlane *et al.*, 1977 ; Siegel et Schmidt, 1979). Cette solubilisation s'effectue essentiellement au cours du barattage. Les protéines solubles forment un gel autour des muscles et coagulent ensuite au cours de la cuisson, garantissant la cohésion des pains de viande.

La couleur rose du jambon est liée à l'ajout de nitrite ($NaNO_2$) sous forme de sel nitrité. A de fortes concentrations, le nitrite est toxique, il est donc dilué avec du sel fin à 0,6 % m/m. Initialement, la viande crue est de couleur rouge. Comme illustré dans la Figure 2, dans la viande crue, la myoglobine oxygénée est de couleur rose (oxymyoglobine) et la myoglobine oxydée de couleur marron (metmyoglobine). Après cuisson, la metmyoglobine dénaturée, marron clair, ne correspond pas à la couleur attendue pour le produit, comme c'est le cas par exemple du rôti de porc. En revanche, lorsque du nitrite est ajouté à la viande crue, l'oxyde nitrique (NO) dérivé du nitrite se lie à l'hème de la myoglobine (Hoagland, 1914). Cela forme la nitrosomyoglobine de couleur rouge foncé, qui une fois cuite, a une couleur rose typique du jambon.

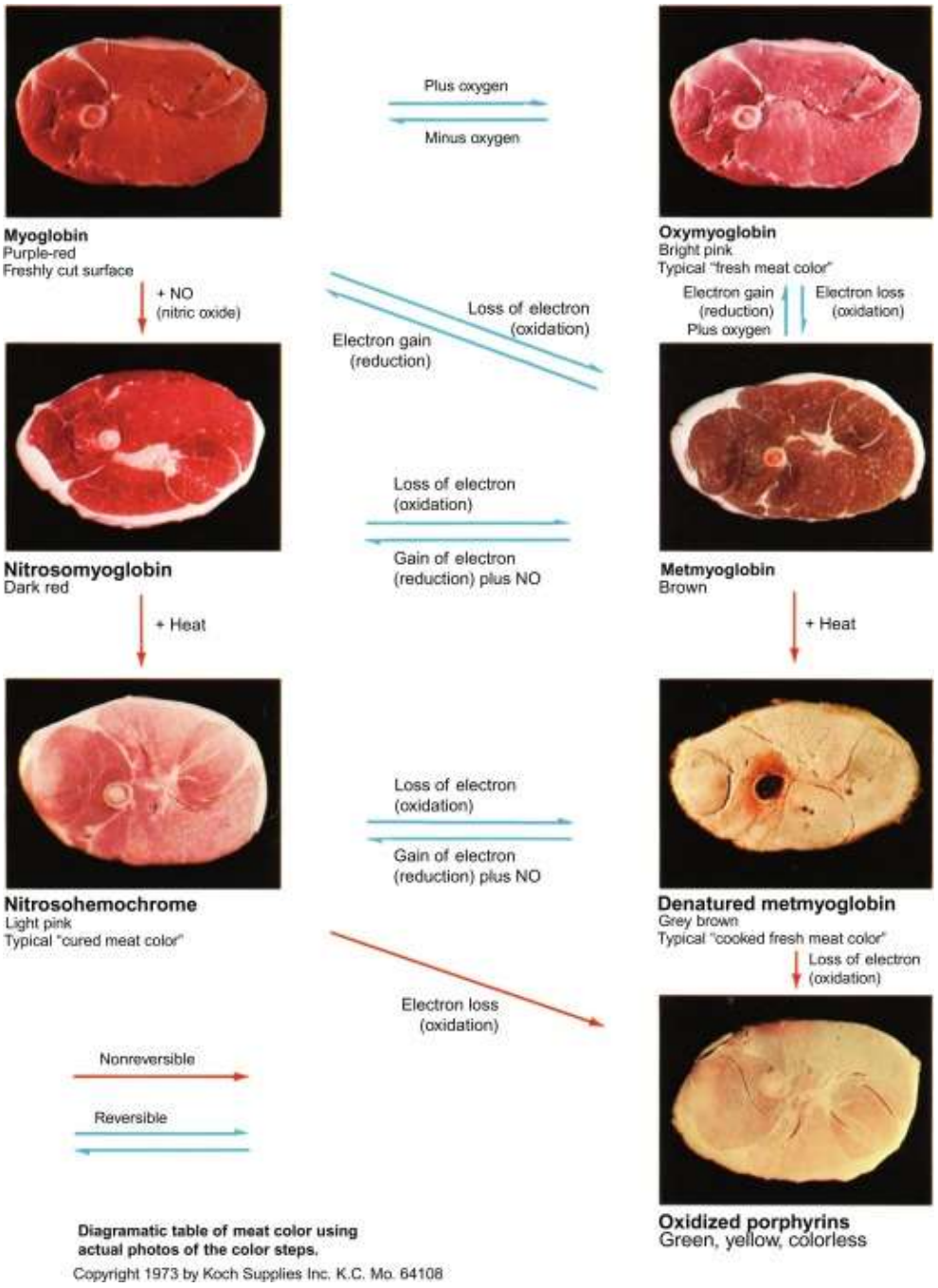


Figure 2 : Lien entre les formes de la myoglobine du muscle et la couleur des jambons.

Extrait de Parthasarathy et Bryan (2012).

Enfin, le goût typique des produits de salaison est lié à l'ajout de sel et de nitrite qui contribuent à la flaveur : le sel est un exhausteur de goût et le nitrite limite la production de composés oxydés odorants. Le 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-methyldithiofuran, et le bis-2-methyl-3-furyl-disulfide ont été identifiées comme les molécules soufrées responsables de l'arôme du jambon cuit. En

l'absence de nitrite, des composés d'oxydation odorants se forment et modifient l'arôme du produit (Thomas, 2014).

1.1.2.3 Garantie de la sécurité microbiologique

Si le sel et le nitrite ont un rôle clé dans l'établissement des propriétés sensorielles des jambons, ils ont également un rôle de conservateur. Dès l'Antiquité, les hommes ont eu recours à l'utilisation de sel pour la conservation des produits de la mer puis des produits carnés (Binkerd et Kolari, 1975). Il a été remarqué que la contamination accidentelle du sel par du salpêtre, également connu sous le nom de « sel de pierre » (nitrate de potassium) améliorait la conservation de la viande. Par la suite il a été constaté que du nitrite se formait à partir du nitrate au contact de la viande sous l'action de microorganismes. Le nitrite s'est révélé être la molécule active dans la conservation, le nitrate servant de source de nitrite. Désormais, le nitrite peut être utilisé directement pour la fabrication de charcuteries et prévenir le développement de bactéries pathogènes comme *Clostridium botulinum* (Christiansen *et al.*, 1974 ; Pierson *et al.*, 1983), dont les spores peuvent résister à la cuisson. Cette bactérie est responsable de la production de la toxine botulique, un poison neurotoxique puissant (agent du botulisme). Le nitrite est également utilisé pour limiter le développement d'autres pathogènes comme *Listeria*, agent de la listériose ou *Salmonella*, agent de la salmonellose (Christieans *et al.*, 2018 ; Junttila *et al.*, 1989).

Plus généralement, le sel et le nitrite inhibent la croissance des bactéries (y compris des bactéries d'altération) et contribuent à prolonger la durée de vie du produit.

Ainsi, en sortie de production, un jambon est supposé répondre à ces critères sensoriels et microbiologiques standards pour lesquels le sel et le nitrite ont un rôle essentiel.

1.1.3 Vers une réduction du sel et du nitrite dans le jambon

1.1.3.1 Contribution des produits carnés aux apports en sel et en nitrite dans l'alimentation

Les produits carnés contribuent à hauteur de 11 % à l'apport en sel moyen chez l'adulte et à 39 % à l'apport en nitrite (Figure 3). Or, une surconsommation de sel et de nitrite peut présenter des risques pour la santé du consommateur.

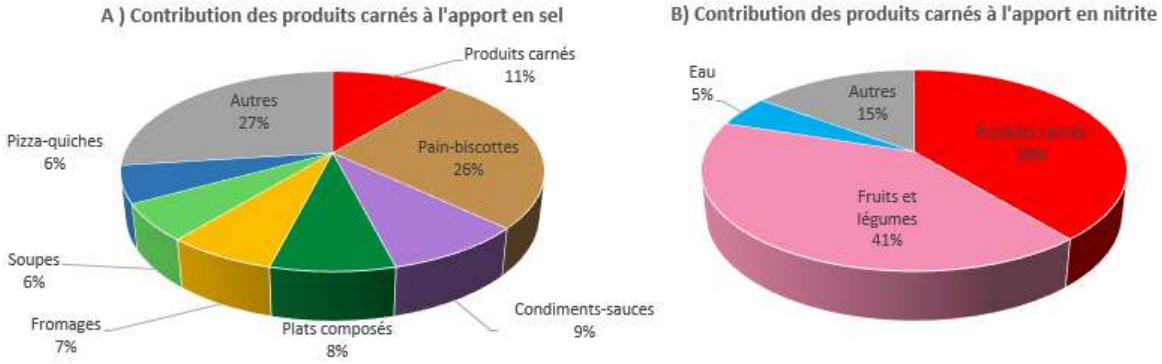


Figure 3 : Contribution des produits carnés à l'apport journalier en sel et en nitrite.

Graphique A adapté d'un rapport de l'ANSES (2009) ; Graphique B d'après EFSA (2008).

1.1.3.2 Une surconsommation de sel augmente la pression artérielle

L'Organisation Mondiale de la Santé préconise une consommation maximale de 5 g de sel par jour (Nishida *et al.*, 2004), alors que la consommation moyenne en France est proche de 8 g par jour. Le lien entre une surconsommation de sel et une augmentation de la pression artérielle (et ainsi une augmentation des risques d'accidents cardio-vasculaires) est bien connu (Ha, 2014 ; Meneton *et al.*, 2005 ; Sanders, 1996). Les reins filtrent le sang et éliminent de l'urée, de l'eau et des sels minéraux. Un excès de sodium augmente la pression artérielle et les reins compensent ce phénomène par une augmentation de l'excrétion d'eau et de sel sous forme d'urines. Cela impacte par la même occasion l'excrétion de calcium, ce qui fragilise les os et favorise l'ostéoporose (Cappuccio *et al.*, 2000 ; Caudarella *et al.*, 2009). Cette excrétion augmente également le risque de cristallisation du calcium

au niveau des voies urinaires et favorise la formation de calculs rénaux ou urinaires (Cappuccio *et al.,* 2000 ; Sakhaee *et al*., 1993).

Il semblerait qu'une forte consommation de sel favorise aussi une colonisation gastrique par la bactérie cancérigène *Helicobacter pylori* (Honda *et al*., 1998 ; Watanabe *et al.*, 1998), ainsi que la production d'agents mutagènes chimiques impliqués dans le cancer de l'estomac (Ngoan et Yoshimura, 2003 ; Wang *et al.*, 2009). Enfin, une augmentation de la consommation de sel de 1 g par jour augmente de 27 % le risque d'obésité chez l'humain (Ma Yuan *et al.*, 2015).

1.1.3.3 Une surconsommation de charcuterie augmente le risque de cancer colorectal

Le CIRC (Centre International de Recherche contre le Cancer) a classé en 2018 la « cancérogénicité de la consommation de viande rouge et viande transformée ». Au niveau national, le terme de « viandes transformées » se réfère principalement aux charcuteries. L'Institut National du Cancer (INCa, 2015) a également signalé les risques d'une surconsommation de charcuterie chez l'Homme : une corrélation positive existe entre la consommation de charcuterie et le cancer colorectal ou du pancréas. Ainsi, une augmentation de 50 g/jour de la dose de charcuterie ingérée (soit l'équivalent d'une tranche de jambon cuit) augmente les risques de cancer colorectal de 18 % (Chan *et al.*, 2011) et de cancer du pancréas de 19 % (Larsson et Wolk, 2012). Pour limiter ces risques, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) préconise une consommation de charcuterie ne dépassant pas 25 g par jour (ANSES, 2006). La dose d'ingestion journalière de nitrite à ne pas dépasser est de 0,06 mg par kilogramme de masse corporelle (Mortensen *et al.*, 2017), conformément aux recommandations de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA).

Trois principales hypothèses peuvent expliquer l'effet promoteur des charcuteries (Pierre, 2019) sur la cancérogénèse colorectale : la production d'amines hétérocycliques (potentiels agents mutagènes)

au cours de la cuisson, la présence de fer héminique et la quantité de composés N-nitrosés générés au cours de la cuisson ou sous l'action de micro-organismes (Cross *et al.*, 2010).

Le nitrate/nitrite favorise les réactions de nitrosation et de nitrosylation aboutissant à la formation de composés N-nitrosés tels que les amines biogènes mis en hypothèse pour expliquer l'effet promoteur des charcuteries dans la cancérogenèse colorectale. Cependant, d'autres composés semblent avoir un rôle, comme le fer héminique de la viande, qui catalyse la formation de composés N-nitrosés ainsi que la réaction de peroxydation des lipides produisant des aldéhydes cytotoxiques et susceptibles d'induire des lésions de l'ADN chromosomique (Bastide *et al.*, 2011) ou encore les amines hétérocycliques.

L'utilisation du nitrite est soumise à une règlementation européenne, autorisant une quantité maximale d'incorporation de 150 mg/kg dans les produits carnés crus et cuits à basse température et de 100 mg/kg dans les produits carnés traités thermiquement et stérilisés (conformément à l'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen).

En France, les politiques publiques se sont récemment saisies de ce sujet avec le vote en commission le 15 octobre 2019 d'un amendement au projet de loi de financement de la sécurité sociale, pour la taxation des industriels sur des produits de charcuteries contenant du sel nitrité. L'Assemblée a finalement refusé cet amendement, le jugeant trop prématuré.

Nous comprenons ainsi l'enjeu de santé publique, mais également l'enjeu industriel et économique que représente la réduction du sel et du nitrite dans les produits de la charcuterie. Or, cette réduction est susceptible de modifier le développement de bactéries pathogènes ou de bactéries d'altération, avec des conséquences possibles sur la sécurité des aliments et la conservation du produit.

1.1.4 Modifications sensorielles induisant un refus des consommateurs

1.1.4.1 Défauts sensoriels

Sur un jambon contenant des concentrations standards en sel et en nitrite, un écosystème bactérien existe sans conséquence sur la qualité du produit et la santé du consommateur, cependant la croissance non contrôlée de certaines bactéries peut induire des défauts sensoriels. L'altération peut être visuelle (décoloration/verdissement, exsudat, emballage gonflé, colonies), olfactive (mauvaises odeurs) ou encore gustative (acidité, goût rance). Si un léger blanchiment de la viande et des odeurs rances peuvent être partiellement liés à un phénomène naturel d'oxydation des lipides (Love et Pearson, 1971), les autres signes d'altération sont attribués à un développement bactérien. Ce sujet sera développé plus tard dans la partie 1.3. *Communautés bactériennes et altération des produits carnés*.

1.1.4.2 La DLC, un indicateur de la qualité microbiologique ?

Afin d'indiquer aux consommateurs la date limite jusqu'à laquelle un produit périssable comme le jambon peut être consommé sans présenter de risque pour la santé ou de défaut d'altération, les industriels indiquent une Date Limite de Consommation (DLC). Une fois cette date passée, il n'est pas garanti que le produit soit non altéré. La DLC est variable en fonction du type d'emballage. Ainsi, un jambon cuit artisanal exposé à l'air a généralement une DLC de quelques jours, tandis qu'un jambon sous vide ou sous atmosphère protectrice a une DLC de 3 à 4 semaines.

La DLC est fixée au terme d'essais de vieillissement à des températures contrôlées simulant un stockage au cours de la logistique (1/3 de la durée de vie à 4 °C), un acte d'achat sous forme de rupture de froid (2 h à 20 °C), puis un stockage chez les consommateurs (2/3 de la durée de vie à 8 °C). Outre le fait de ne présenter aucun défaut organoleptique à DLC, les jambons doivent respecter des critères microbiologiques établis sur la base de dénombrements de bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, ou encore *Salmonella enterica* et *Clostridium botulinum*. Comme indiqué dans la Table 1, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de

l'environnement et du travail (ANSES) recommande également à titre indicatif le dénombrement de la flore totale mésophile et de bactéries potentiellement altérantes comme les bactéries lactiques ou les Entérobactéries.

La DLC n'est pas toujours un indicateur fiable. Bien que les jambons ne soient généralement pas altérés à cette date, il arrive parfois que certains s'altèrent prématurément (Geeraerts *et al.*, 2017 ; Piotrowska-Cyplik *et al.*, 2017).

Table 1 : Critères microbiologiques applicables au jambon cuit

Micro-organisme ou flore recherchés	**Critère en sortie de production (début de stockage)**	**Critère à DLC**
Listeria	Absence dans 25 g	Moins de 100 ufc/g
Clostridium	-	A rechercher
Salmonella	-	A rechercher
Escherichia coli	-	Moins de 10 ufc/g
Staphylocoques à coagulase	Moins de 100 ufc/g	-
Entérobactéries	Moins de 50 ufc/g	-
Flore aérobie mésophile (30°C) =flore totale	Moins de 10 000 ufc/g	Moins de 1 000 000 ufc/g
Flore lactique	-	A rechercher
Rapport Flore totale/flore lactique : ratio à appliquer en cas de dépassement de la flore totale à DLC		100

D'après le rapport de l'ANSES (2008) sur les indicateurs d'hygiène des procédés applicables au jambon cuit.

L'altération du jambon cuit sous vide consiste généralement en la production d'un exsudat laiteux et d'acide (pH à 5,6) et survient lorsque les bactéries lactiques sont autour de 10^7 ufc/g (Björkroth et Korkeala, 1997 ; Comi et Iacumin, 2012). Ce même niveau de population de bactéries lactiques à 10^7 ufc/g est également reporté par Korkeala (1989) comme un seuil d'altération dans les saucisses stockées sous vide.

Par ailleurs, le niveau de population n'est pas le seul paramètre qui conditionne l'altération. Geeraerts (2017) a montré que des jambons cuits avec des charges bactériennes élevées

(supérieures à 10^8 ufc/g) n'étaient dans la plupart des cas pas altérés à DLC : sur 27 échantillons présentant une charge bactérienne élevée, seuls deux avaient des signes d'altération (décolorations/verdissements ou pH trop acide). L'intensité de l'activité métabolique des bactéries est donc également à prendre en compte. Elle varie en fonction des groupes bactériens présents (Remenant *et al.*, 2015) et même au sein d'une même espèce entre différentes souches. En comparant le potentiel d'altération de différentes souches de *Leuconostoc camosum* dans des jambons, Björkroth (1998) a identifié une souche à croissance particulièrement rapide, dont la présence est associée à la production d'exsudat et à de mauvaises odeurs.

Ainsi, pour comprendre le rôle des bactéries dans l'altération, il est nécessaire de prendre en compte à la fois la quantité et la diversité des bactéries présentes.

1.2 LES COMMUNAUTES BACTERIENNES DANS LES PRODUITS CARNES ET PLUS PARTICULIEREMENT DANS LE JAMBON

1.2.1 La notion de diversité bactérienne

Etudier l'écologie microbienne d'un environnement revient à identifier quels micro-organismes sont présents, se développent et interagissent entre eux et avec cet environnement. La colonisation microbienne d'un environnement résulte de phases de compétitions entre différents micro-organismes. Ainsi, les espèces les moins compétitives sont peu à peu dominées par les espèces les plus adaptées. Pour analyser les comportements microbiens et leur dynamique, il est nécessaire de recenser les espèces présentes et d'avoir accès à leur abondance dans la communauté. La diversité bactérienne est définie par la richesse, c'est-à-dire le nombre d'espèces, et par l'équilibre des abondances (*evenness*) de ces espèces (Heip *et al.*, 1998 ; Tuomisto, 2012).

1.2.1.1 Méthodes culturales classiquement utilisées pour l'identification d'isolats

Classiquement, l'analyse des bactéries présentes dans un environnement nécessite une phase d'isolement sur milieu de culture. On cherche ensuite à identifier ces bactéries. Or, du fait de la

petite taille des cellules bactériennes, l'identification basée sur des critères morphologiques est limitée (Emerson *et al.*, 2008). Les attributs bactériens métaboliques étant multiples, les bactéries peuvent également être identifiées selon des critères biochimiques, sur la base d'activités métaboliques ou en fonction de leur capacité de croissance sur des milieux plus ou moins sélectifs, mais ces techniques ne permettent pas d'identifier tous les micro-organismes et nécessitent qu'ils soient préalablement cultivés.

1.2.1.2 Méthodes d'identification à partir des acides nucléiques

Dans les années 1990, les progrès en biologie moléculaire ont permis d'identifier les bactéries présentes dans un échantillon à partir de leur ADN (Erlich *et al.*, 1988). Cette reconnaissance repose sur le principe que chaque groupe bactérien a un génome qui lui est propre (résultant de mutations progressives au cours de l'évolution). La phylogénie permet de distinguer les génomes bactériens, de retracer leur origine généalogique et la taxonomie prend en compte la classification de séquences génomiques en différents niveaux phylogénétiques. Les bactéries sont ainsi classées en règne, domaine, phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce (du plus vaste au plus spécifique).

L'identification bactérienne s'effectue généralement sur la base d'un fragment d'ADN correspondant à une séquence signature, caractéristique d'un groupe bactérien donné. Ainsi, l'identification peut être effectuée directement à partir des ADN des bactéries récoltées d'un échantillon, sans nécessiter d'étape préalable de culture. Cette approche a révélé l'existence de taxons qui n'avaient encore jamais été isolés sur les milieux de culture utilisés. C'est le cas par exemple d'une espèce rencontrée dans les produits de la mer altérés, appartenant à la famille des *Fusobacteriaceae* (Chaillou *et al.*, 2015).

Parmi les méthodes d'identification fréquemment utilisées, on trouve des méthodes ciblant des taxons bactériens spécifiques comme l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la PCR quantitative

avec des amorces spécifiques des taxons recherchés ou encore les micropuces à ADN (Justé *et al.*, 2008).

Pour une analyse plus globale, à l'échelle d'une communauté bactérienne dont on ne connait pas forcément toutes les espèces, l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments terminaux (T-RFLP) ou encore le séquençage d'amplicons sont des techniques fréquemment utilisées (Justé *et al.*, 2008). Pour augmenter la quantité d'ADN bactérien et cibler certaines régions d'ADN préalablement à l'identification, une phase d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est généralement nécessaire avant l'application de ces techniques.

Avec le développement des technologies de séquençage haut débit en 2005 et les progrès informatiques en matière de stockage et de gestion des données à haut débit, le séquençage est devenu une approche de choix pour l'analyse de la diversité. Si les techniques DGGE et T-RFLP permettent principalement la détection de la plupart des bactéries dominantes (Dolci *et al.*, 2015 ; Doulgeraki *et al.*, 2012), l'approche de séquençage peut également détecter les bactéries sous-dominantes en fonction de la profondeur de séquençage et donne accès à leurs abondances relatives (méthode dite semi-quantitative). Ainsi, par exemple, un échantillon de bactéries à 8 $\log_{10}$ ufc/g séquencé avec une profondeur de 100 000 séquences permettra d'accéder à l'abondance relative des bactéries sur une profondeur de 5 $\log_{10}$.

La métagénomique globale pour étudier la diversité fonctionnelle

L'approche de métagénomique est la plus complète pour décrire la diversité structurale et la diversité fonctionnelle (basée sur l'étude de gènes codant pour des protéines ; Escalas *et al.*, 2019) portée par un ensemble de micro-organismes. Elle donne ainsi accès à l'ensemble des génomes des micro-organismes d'un échantillon, incluant ceux des bactéries, mais aussi ceux des levures, moisissures ou archées puisque aucune région spécifique n'est ciblée (Eloe-Fadrosh *et al.*, 2016).

Cette approche a été largement utilisée pour étudier différents environnements comme les environnements marins (Cerqueira *et al.*, 2018 ; Tully *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2018), les sols (Ahmed *et al.*, 2018 ; Feng *et al.*, 2018 ; Gastauer *et al.*, 2019) ou encore le microbiote intestinal (Almeida *et al.,* 2019 ; Gill *et al.,* 2006*)*. Cet essor a également bénéficié à l'étude des écosystèmes alimentaires (Ercolini, 2013), notamment ceux des fromages (Dugat-Bony *et al.*, 2015) et des boissons ou aliments fermentés (Jung *et al.*, 2011 ; Verce *et al.*, 2019 ; Walsh *et al.*, 2017). Cette approche est relativement peu utilisée pour étudier les écosystèmes carnés, à l'exception d'une étude récente visant à comprendre l'implication de communautés bactériennes de saucisses fermentées dans la production de différents composés volatils au cours de la maturation (Ferrocino *et al.*, 2018).

La métagénétique ou métagénomique ciblée pour étudier la diversité structurale

Une approche plus partielle pour décrire la structure des communautés est l'amplification et le séquençage d'un gène donné, généralement le gène codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (gène *SSU* rRNA), ARN non codant responsable de la traduction des ARN messagers en protéines (Klindworth *et al.,* 2013). Ce gène présente l'avantage d'être ubiquitaire chez les procaryotes, de ne pas être sujet à des transferts de gènes horizontaux et d'être largement décrit dans les bases de données de référence (comme GenBank, SILVA ou encore EZ taxon). Il s'agit d'un gène d'environ 1500 pb (paires de base), présentant des régions conservées communes à tous les taxons et des régions variables (V1 à V9 ; voir Figure 4) résultant de mutations au cours de l'évolution et permettant de discriminer les différents taxons.

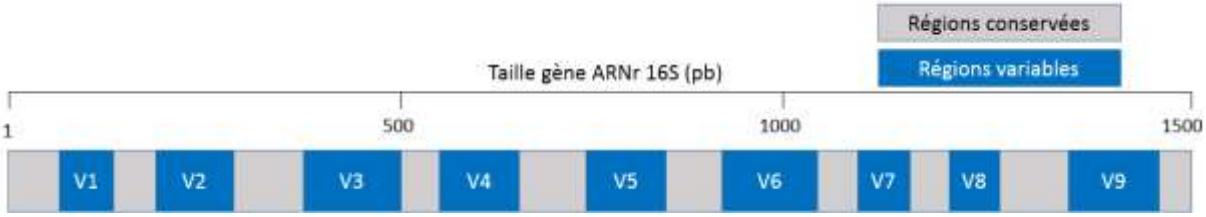


Figure 4 : Gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S présentant des régions variables et des régions conservées.
Inspiré de Shahi (2017).

Le séquençage d'une seule région variable ne permet généralement pas de distinguer les taxons bactériens à l'échelle du genre ou de l'espèce, c'est pourquoi des fragments d'ADN contenant plusieurs régions variables sont généralement amplifiés à l'aide d'un couple d'amorces s'hybridant dans des régions conservées. Les séquences phylogénétiquement proches sont ensuite regroupées en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) assignées à des taxons biologiques. Pour le gène *SSU* rRNA, il a été défini que 97 % d'homologie de séquence constituait la limite de l'espèce, 90-95 % la limite du genre et 80-90 % la limite de la famille (Kim *et al.*, 2014 ; Konstantinidis et Tiedje, 2005 ; Qin *et al.*, 2014). L'assignation taxonomique s'effectue généralement par alignement de séquences sur le génome du représentant le plus proche disponible dans les bases de données. Dans le cas où les micro-organismes ne sont pas connus et/ou n'ont pas de représentant référencé, il peut arriver que l'affiliation ne soit possible qu'à des niveaux taxonomiques plus larges que l'espèce ou le genre (Werner *et al.*, 2012).

Cette approche de métagénétique basée sur l'étude du gène *SSU* rRNA a largement bénéficié à l'étude des écosystèmes carnés (Benson *et al.*, 2014 ; Chaillou *et al.*, 2015 ; De Filippis *et al.*, 2013 ; Fougy *et al.*, 2016 ; Hultman *et al.*, 2015 ; Jääskeläinen *et al.*, 2016 ; Lauritsen *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2019 ; Nieminen *et al.*, 2012 ; Quijada *et al.*, 2018 ; Raimondi *et al.*, 2018, 2019 ; Rouger *et al.*, 2018 ; Säde *et al.*, 2017 ; Stellato *et al.*, 2016 ; Zhao *et al.*, 2015). Ces travaux seront présentés plus en détail dans la partie 1.2.2 *Sources de contaminations possibles au cours des étapes de production*.

Dans le cas d'espèces phylogénétiquement proches, le gène *SSU* rRNA a un faible pouvoir résolutif lorsqu'il est utilisé sur des portions variables courtes et l'assignation est limitée au niveau du genre (Dahllöf *et al.*, 2000 ; Head *et al.*, 1998 ; Větrovský et Baldrian, 2013). Par ailleurs, le nombre de copies du gène *SSU rRNA* par génome varie d'une espèce à l'autre de 1 à 15 copies chez les bactéries (voir Figure 5) et jusqu'à 5 copies chez les archées, ce qui peut biaiser l'estimation des abondances relatives (Angly *et al.*, 2014 ; Case *et al.*, 2007 ; Crosby et Criddle, 2003 ; Větrovský et Baldrian, 2013).

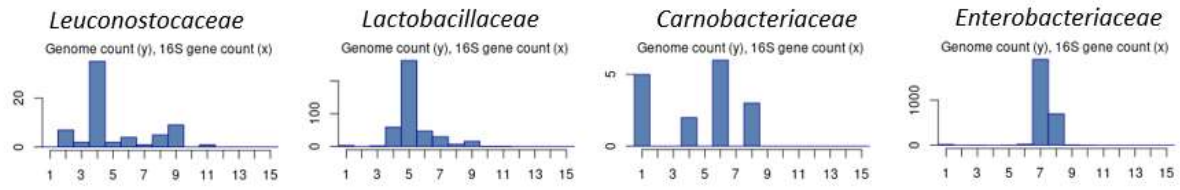


Figure 5 : Nombre de copies du gène SSU rRNA au sein de différentes familles bactériennes présentes dans les produits carnés.

Résultats de recherches dans la base de donnée Ribosomal RNA Database https://rrndb.umms.med.umich.edu/search/ (Stoddard et al., 2015).

De plus, ce gène est également présent chez des organites comme les chloroplastes (Hanshew *et al.*, 2013) et les mitochondries (Yang *et al.*, 2014). En effet, chloroplastes, mitochondries et bactéries présentent une forte similarité de patrimoine génétique (dont le gène *SSU* rRNA). C'est d'ailleurs un argument soutenant la théorie de l'endosymbiose (Martin *et al.*, 2015), selon laquelle ces organites seraient d'origine bactérienne. Ainsi, si les séquences correspondant au gène *SSU* rRNA de mitochondries ou de chloroplastes sont détectées, il faut procéder à une étape de filtrage pouvant conduire à une perte de la profondeur de séquençage. Des études récentes ont reporté que les séquences correspondant au gène *SSU* rRNA des chloroplastes des épices pouvaient représenter 60 % des séquences sur la saucisse de volaille (Chaillou *et al.*, 2015) et 20 % des séquences sur le bacon (Li *et al.*, 2019).

Pour ces raisons, d'autres marqueurs moléculaires ont été proposés (Barret *et al.*, 2015 ; Case *et al.*, 2007 ; Dahllöf *et al.*, 2000 ; Roux *et al.*, 2011). Ces gènes codant pour des protéines, comme *fusA* (codant pour un facteur d'élongation G pour la synthèse de protéines), *rpoB* (codant pour la sous-unité *bêta* de l'ARN polymérase), *nifD* (codant pour la sous-unité D de la dinitrogénase), *recA* (codant pour l'ADN recombinase) ou encore *gyrB* (codant pour la sous-unité *bêta* de l'ADN topoisomérase), sont moins conservés que le gène *SSU* rRNA. Ils ont de ce fait une meilleure capacité résolutive pour identifier des espèces proches d'un point de vue évolutif. Cependant, la variabilité de leurs séquences complique le design d'amorces génériques pour le profilage de communautés. Parmi ces gènes, le gène *gyrB*, universel et en copie unique chez les bactéries, présents chez les eucaryotes et

parfois chez les archées, est un bon candidat pour le profilage des communautés. Des amorces génériques ont été développées initialement dans le cadre d'un suivi dynamique des communautés microbiennes des graines de *Brassicaceae* au cours de la germination (Barret *et al.*, 2015). Pour ce marqueur, le seuil de l'espèce correspond à 94-95 % d'homologie de séquences. Dans une étude récente (Poirier *et al.*, 2018b), le pouvoir de discrimination taxonomique des gènes *gyrB* et *SSU rRNA* (région V3-V4) a été comparé dans les communautés microbiennes de produits carnés et de la mer. La Figure 6 montre que des OTUs assignées à une même espèce (par exemple à *Serratia liquefasciens*) en utilisant le gène *SSU rRNA* peuvent en réalité correspondre à différentes espèces, qui sont détectées avec le gène *gyrB* (comme *Serratia proteamaculans*, *Serratia liquefasciens* et *Serratia fonticola*). De plus, en regroupant les séquences de manière plus restrictive sur la base de 97-98 % d'homologie, le marqueur *gyrB* donne accès à la diversité intra-espèce et permet, par exemple, de distinguer les deux sous-espèces de *Leuconostoc gelidum*. A ce jour, ce marqueur qui permet d'estimer de façon plus précise la diversité dans les écosystèmes carnés ou de la mer est encore relativement peu utilisé (Broekaert *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2018b).

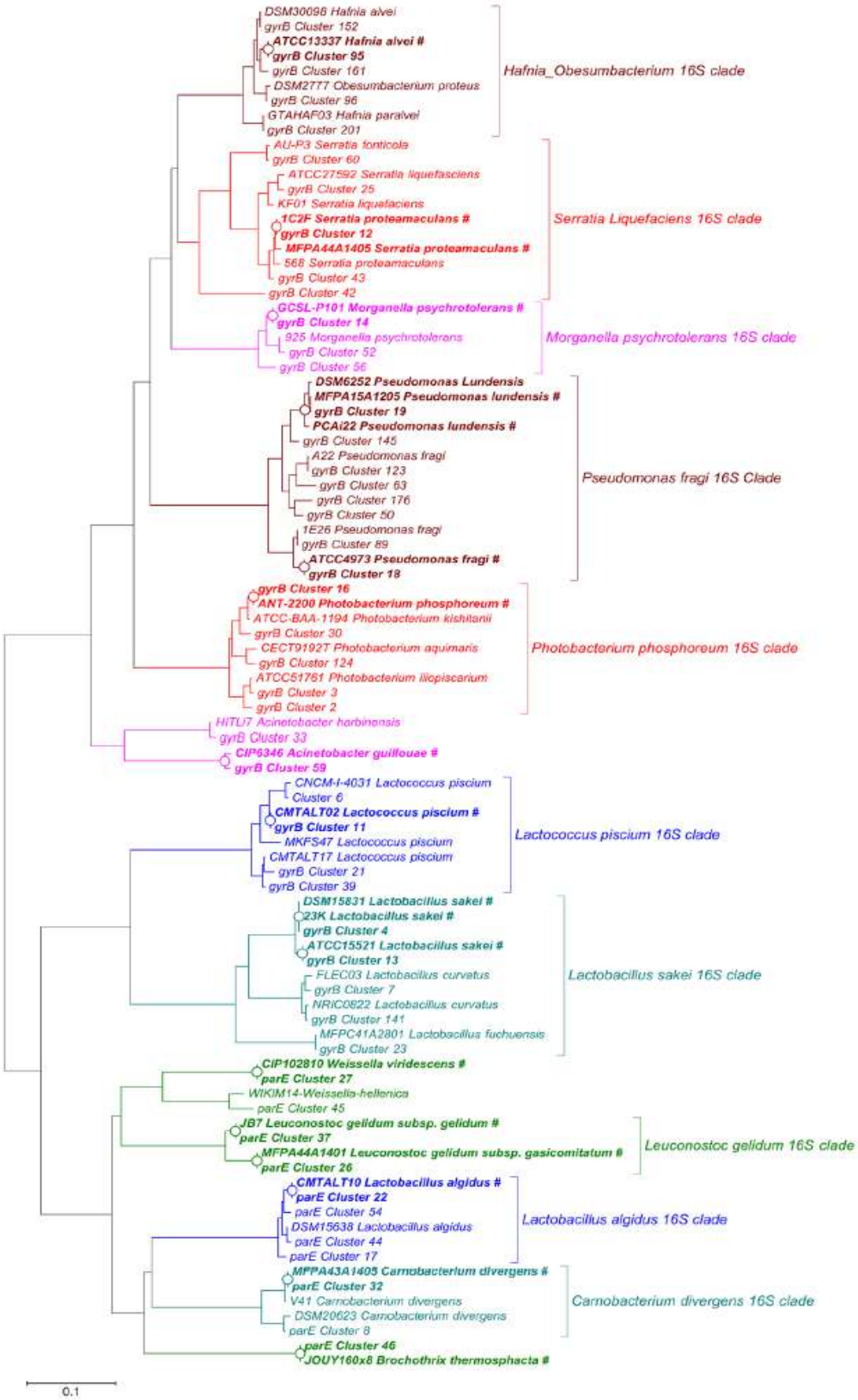


Figure 6 : Arbre phylogénétique non enraciné produit à l'aide d'un algorithme « neighbour-joining » illustrant le pouvoir de discrimination du gène gyrB au seuil de l'espèce et intra-espèces par rapport au gène SSU rRNA.

Extrait de Poirier (2018b).

1.2.1.3 Les indicateurs de diversité

Diversité intra-échantillon

La diversité intra-échantillon, également appelée alpha-diversité, mesure la diversité au sein d'un unique échantillon. Le nombre d'espèces présentes dans un échantillon donné constitue un indice de diversité alpha. Cet indicateur permettant d'estimer la richesse spécifique dans un échantillon a bénéficié à l'étude des produits carnés. Il a par exemple permis d'étudier l'évolution de la diversité au cours du stockage (Chaillou *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2019 ; Raimondi *et al.*, 2019), de comparer l'influence de différents traitements (Benson *et al.*, 2014 ; Fougy *et al.*, 2016) ou encore de comparer des échantillons issus de différentes zones de prélèvement (Stellato *et al.*, 2016).

Diversité inter échantillon

La diversité inter-échantillons, également appelée beta-diversité permet de comparer les diversités respectives des différents échantillons deux à deux. Il existe deux grands types de distances : des distances compositionnelles et des distances phylogénétiques. La distance compositionnelle prend en compte uniquement les espèces présentes dans un échantillon, sans considérer leur lien généalogique, tandis que la distance phylogénétique prend également en compte l'éloignement phylogénétique des différentes espèces. Parmi les distances les plus utilisées pour comparer des communautés microbiennes, on peut citer la distance Bray-Curtis et la distance UniFrac.

La distance Bray-Curtis (également appelée indice de dissimilarité de Bray-Curtis), mesure une distance compositionnelle entre les communautés bactériennes de deux échantillons. Cette distance tient compte de l'abondance des espèces. Elle correspond à la somme des écarts d'abondance de chaque espèce entre les communautés A et B, rapportée à la somme des abondances de ces espèces dans les deux communautés. Ainsi, plus les écarts d'abondance sont importants (communautés éloignées), plus la distance est grande.

$$\mathrm{BC}_{AB} = \frac{\sum_{i=1}^{k} |Ni_A - Ni_B|}{\sum_{i=1}^{k} (Ni_A + Ni_B)}$$

BC_{AB} : distance Bray-Curtis entre les communautés A et B ; k : nombre total d'espèces dans les communautés A et B ; Ni_A : abondance d'une espèce donnée dans la communauté A ; Ni_B : abondance d'une espèce donnée dans la communauté B.

La distance UniFrac (Lozupone *et al.*, 2011) mesure la distance phylogénétique entre deux communautés bactériennes. On dit que cette distance est non pondérée (Unweighted UniFrac) si elle ne tient pas compte des abondances (Lozupone et Knight, 2005) ou qu'elle est pondérée (Weighted UniFrac) si elle prend en compte l'abondance des différentes espèces (Lozupone *et al.*, 2007).

La distance UniFrac (non pondérée) entre deux communautés A et B, se mesure au sein d'un arbre pylogénétique composé des taxons des deux communautés. Elle correspond à la somme des longueurs des branches conduisant à une espèce présente soit dans la communauté A uniquement, soit dans la communauté B uniquement, rapportée à la somme des longueurs de toutes les branches (voir Figure 7). La distance UniFrac (pondérée) se calcule sur le même principe en pondérant les distances de chaque branche par l'écart entre l'abondance relative du/des taxon(s) de la branche dans la communauté A et leur abondance relative dans la communauté B.

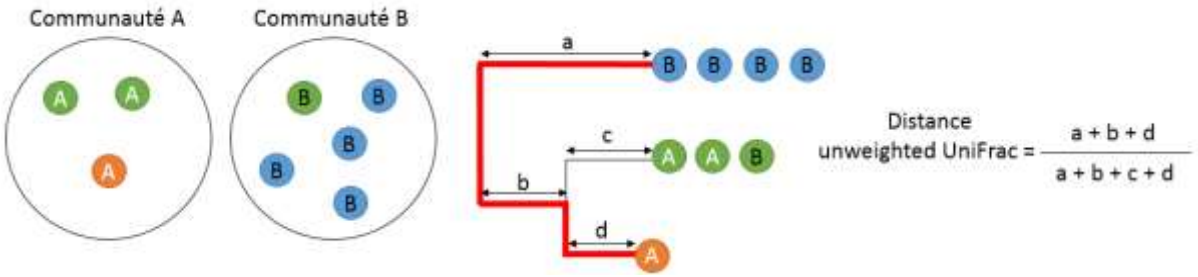


Figure 7 : Exemple de calcul de distance UniFrac entre deux communautés A et B.

Dans de nombreuses études d'écologie microbienne des produits carnés, ces distances ont permis d'estimer l'éloignement compositionnel ou phylogénétique de communautés microbiennes (Chaillou

et al., 2015 ; De Filippis *et al.*, 2013 ; Ferrocino *et al.*, 2016 ; Hultman *et al.*, 2015 ; Poirier *et al.*, 2018b ; Pothakos *et al.*, 2015c ; Raimondi *et al.*, 2018 ; Säde *et al.*, 2017).

Ces indicateurs ont contribué à une meilleure compréhension de la dynamique des communautés microbiennes en fonction de paramètres environnementaux ou au cours du stockage et peuvent être des outils pour suivre la dynamique de communautés bactériennes dans différents environnements tels que les abattoirs ou les usines de production.

1.2.2 Sources de contaminations possibles au cours des étapes de production

1.2.2.1 Sources de contamination de la viande crue

Le muscle est stérile chez un animal en bonne santé (Elmossalami et Wassef, 1971), mais dès les premiers stades de la découpe, il entre en contact avec des micro-organismes. Il s'agit d'une contamination de surface par adsorption des bactéries (Chung *et al.*, 1989 ; Luber, 2009). Différentes stratégies existent pour en identifier les sources : échantillonner directement sur le produit avant ou après une étape de production ou échantillonner l'environnement de production, incluant l'air, le liquide et les surfaces de travail.

Au cours des étapes d'abattage et de découpe des carcasses, des bactéries associées à l'animal peuvent contaminer la viande crue. Des bactéries telles que *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus equorum*, par ailleurs connues pour être associées à la peau des animaux ont par exemple été observées sur des steaks de bœuf, de veau, de volaille ou encore des dés de lardon en début de stockage (Chaillou *et al.*, 2015 ; De Filippis *et al.*, 2013). Dans le cas du porc, malgré une étape d'échaudage des carcasses après abattage, Wheatley (2014) a montré que la viande crue contenait encore 10^1 ufc/g des 10^6 ufc/g présentes initialement sur la peau des animaux. De plus, des bactéries connues pour être présentes dans les microbiotes intestinaux et environnementaux ont également été retrouvées dans des échantillons de produits animaux (Chaillou *et al.*, 2015).

D'autres bactéries appartenant par exemple à la famille des *Enterobacteriaceae*, peuvent être présentes sur la viande. Comme précisé par le préfixe « entéro- », elles sont connues pour provenir majoritairement du tractus intestinal et sont un indicateur du niveau de contamination fécale. Elles sont en particulier apportées au cours de l'étape d'éviscération (De Filippis *et al.*, 2013 ; Wheatley *et al.*, 2014). Il a également été montré sur de la viande de porc et de bœuf que les parties antérieures (bajoues, poitrine et paleron) des carcasses suspendues par les pieds et recevant les liquides de découpe, présentaient une charge bactérienne plus importante que les parties postérieures (flanc et membres postérieurs) et étaient particulièrement riches en *Enterobacteriaceae* (De Filippis *et al.*, 2013 ; Wheatley *et al.*, 2014). De façon similaire, des bactéries du genre *Prevotella* et *Corynebacterium* connues pour être présentes dans le rumen, ont été recensées sur des steaks de bœuf ou de veau (Chaillou *et al.*, 2015).

Nous comprenons ainsi que le microbiote du tube digestif ou encore de la peau de l'animal peut contaminer la viande. Or, comme le microbiote du tube digestif est susceptible de varier selon l'alimentation des animaux (Liu *et al.*, 2012) et les bactéries de la peau peuvent varier selon leur habitat (Monsallier *et al.*, 2012), des changements de pratiques d'élevage peuvent potentiellement avoir des répercussions sur le microbiote de la viande. Par exemple, sur un produit cru comme du carpaccio de bœuf à DLC issu d'une même usine de production, Lucquin (2012) a constaté une augmentation de la prévalence de *Lactobacillus fuchuensis* et *L. carnosum* par 2 et 1,5 respectivement au printemps ainsi qu'une augmentation de celle de *Brochothrix thermosphacta* par 6 en automne. Dans cette même étude, la prévalence de *Lactobacillus sakei* et *Leuconostoc mesenteroides* était presque 1,5 fois plus importante en été qu'en automne ou au printemps. L'auteur a suggéré que ce changement était en lien avec des modifications des pratiques d'élevage à cette période de l'année (alimentation, environnement).

Le microbiote de la viande crue peut également varier en fonction des surfaces de travail dans l'abattoir. Lauritsen (2019) a montré, par exemple dans le cas de la viande de volaille que

Janthinobacterium lividum, une bactérie d'altération majoritaire en fin de stockage, provenait des surfaces de la ligne de production de l'abattoir. Cette étude a souligné l'importance de l'environnement de production dans la contamination du produit fini car les lots de viande de volaille issus d'une même matière première et ayant suivi un même circuit de production de l'abattage à la fabrication du produit avaient des communautés bactériennes semblables en fin de stockage. De façon similaire, en comparant les communautés microbiennes de cuisses de poulet de différentes marques, Rouger (2018) a constaté que des cuisses de poulet de deux marques différentes mais provenant d'un même abattoir et ayant été produites le même jour présentaient des communautés bactériennes proches (avec des abondances relatives semblables de *Klebsiella*, *Budvica* et *Pseudomonas*). De plus, il a été montré que des bactéries comme *Pseudomonas* sp., *B. thermosphacta*, *Psychrobacter* sp., *S. equorum* présentes sur du bœuf à l'air libre après une semaine de stockage étaient également présentes sur les surfaces de production de l'abattoir (De Filippis *et al.*, 2013). La présence de bactéries comme *Bifidobacterium choerinum* (par ailleurs connue pour être présente dans les fèces animales) dans des environnements de production de viande de porc, suggère une inter contamination de la viande et de l'environnement de production (Gavini *et al.*, 2006). La Figure 8 illustre le fait que la plupart des genres bactériens (*Streptococcus*, *Brochothrix*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Psychrobacter* pour les plus abondants) détectés dans la viande de bœuf ou de porc le sont aussi dans l'environnement de production.

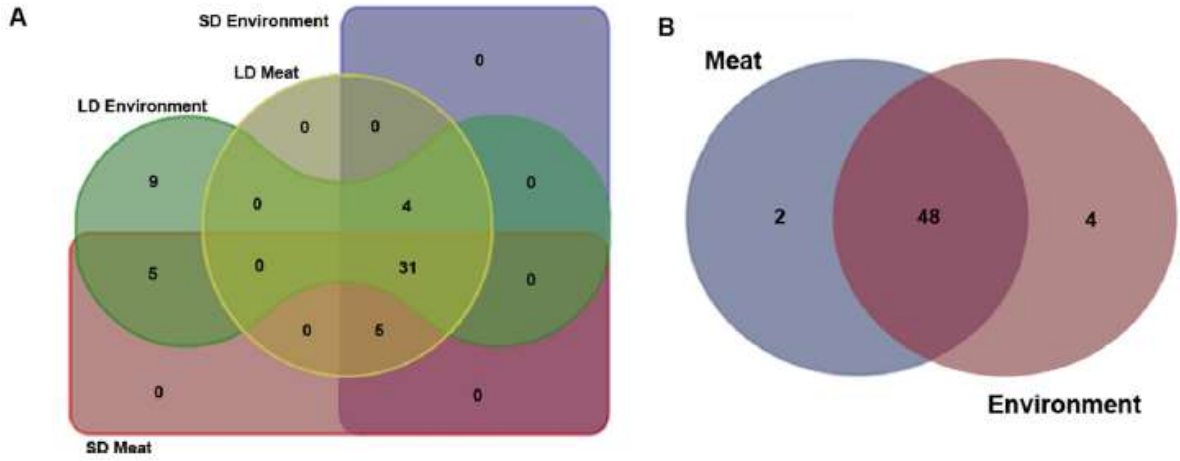


Figure 8 : Diagramme de Venn montrant les genres bactériens communs ou non aux échantillons de viande (porc et bœuf confondus) et aux environnements de production (mains des employés, couteaux, surfaces de travail) dans des abattoirs de grande et de petite distribution.

A : indépendamment dans un abattoir de grande (LD) et de petite distribution (SD); B : tous abattoirs confondus.
Extrait de Stellato (2016).

Ainsi, en fonction des pratiques d'élevage, d'abattage, de découpe et en fonction de l'environnement de production, la contamination de la viande crue varie qualitativement. Elle varie également quantitativement. En effet, d'un lot de viande à un autre, la charge bactérienne sur de la viande crue en sortie de production est généralement de l'ordre de 10^3 à 10^5 ufc/g (Björkroth et Korkeala, 1997 ; Dabassa, 2013 ; Dušková *et al.*, 2016 ; Hultman *et al.*, 2015).

1.2.2.2 Sources de contamination de la viande au cours des étapes de transformation

Dans le cas de produits carnés transformés, la fabrication comprend des étapes de production supplémentaires. Ainsi, après une étape de découpe en abattoir, la viande est généralement acheminée jusqu'à l'usine de production dans des conditions réfrigérées pour y être transformée. Ces étapes peuvent alors complètement modifier les équilibres microbiens initialement présents sur la viande crue et façonner les communautés du produit fini, comme illustré dans la Figure 9 dans le cas du saucisson de León qui est un produit fermenté.

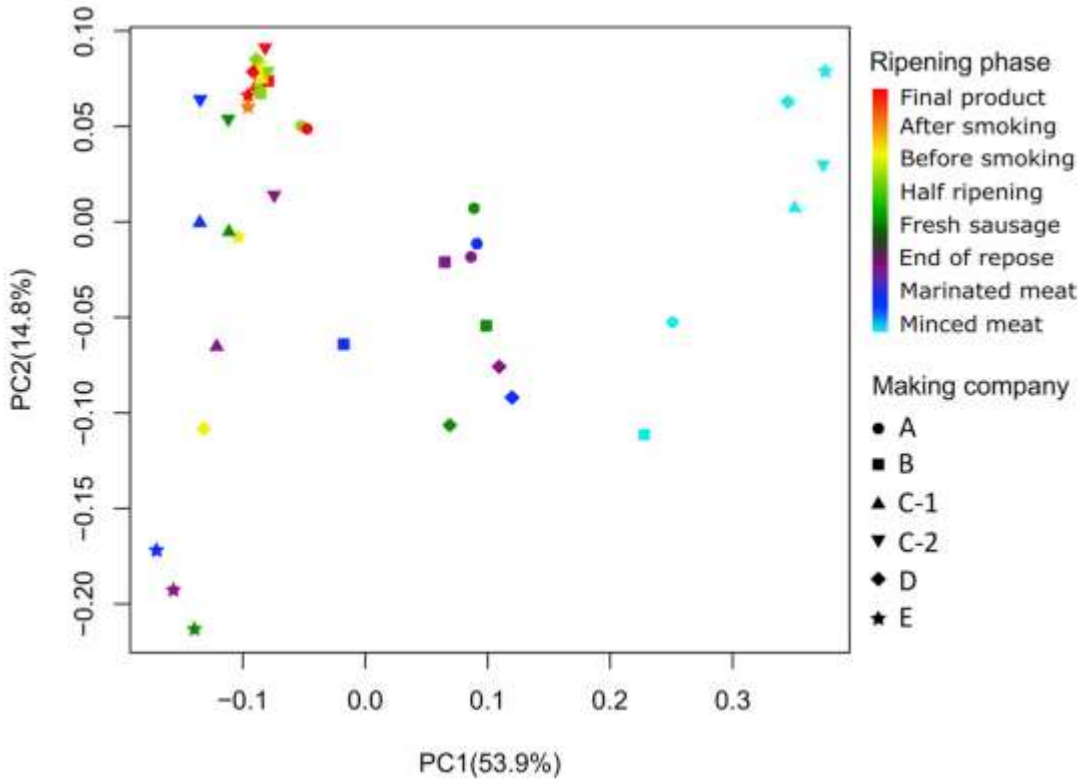


Figure 9 : PCoA montrant l'importance des différentes étapes de transformation dans l'établissement des communautés microbiennes du Chorizo de León.

Extrait de Quijada (2018).

Dans le cas particulier du jambon, la transformation de la viande comprend une étape de saumurage. Comi (2012) a identifié cette étape comme une source de contamination de *Weissella viridescens*, cette même bactérie ayant ensuite été identifiée comme altérante dans le jambon, au moment du stockage après cuisson. Cette bactérie a en effet été retrouvée en plus forte concentration dans le liquide s'écoulant des cavités créées par les aiguilles d'injection de la saumure par rapport au reste du jambon. Les bactéries présentes dans la saumure peuvent être originaires de la viande crue, ou des ingrédients et additifs comme le sel, le nitrite, l'ascorbate, le glucose et éventuellement le bouillon d'épices. En effet, Dušková *et al* (2016) a montré qu'avant injection de la viande de porc, la saumure contenait 1,7 $\log_{10}$ ufc/g de bactéries lactiques alors qu'après injection, cette même saumure en contenait 3,3 $\log_{10}$ ufc/g. Par ailleurs, il a été montré sur des saucisses de porc que les épices pouvaient apporter des bactéries comme *Lactobacillus graminis* devenant par la suite dominantes, ou encore sur des dés de lardons que le sel de mer utilisé pouvait être une source de

contamination de bactéries d'origine marine comme *Pseudomonas* et *Sphingobacterium* (Benson *et al.*, 2014 ; Chaillou *et al.*, 2015).

La saumure contenant du sel et du nitrite peut aussi avoir un effet sélectif sur les bactéries de la viande. Au cours de la phase de barattage pour la production du jambon, la croissance de bactéries lactiques est favorisée, en particulier celle de *Carnobacterium divergens* et de *B. thermosphacta* qui sont dominantes en fin de barattage, ainsi que celle des levures (Samelis *et al.*, 1998). Dans le procédé de fabrication des saucisses de porc, du sel et du nitrite sont également incorporés et il a été montré de façon similaire que cet ajout conduisait progressivement à une dominance des bactéries à Gram-positif (Hultman *et al.*, 2015). Il peut être noté que cette étape de brassage de la viande saumurée peut également conduire à une faible contamination de l'air avec des bactéries lactiques de l'ordre de 10 ufc/ m^3, l'air pouvant par la suite avoir un rôle dans la recontamination du jambon cuit (Björkroth et Korkeala, 1997).

A l'issue du barattage, la charge bactérienne totale est proche de 10^5 ufc/g (Dušková *et al.*, 2016 ; Samelis *et al.*, 1998 ; Vasilopoulos *et al.*, 2010). L'étape de cuisson, généralement à des températures entre 66 et 70°C permet d'éliminer la plupart des cellules bactériennes végétatives, mais certaines bactéries résistent. Les bactéries sporulées comme *Clostridium perfringens* sont résistantes à la cuisson (Franz et von Holy, 1996) ainsi que certaines cellules végétatives thermoduriques. En sortie de cuisson, la charge bactérienne détectée sur les jambons est quasiment nulle ou à moins de 10^2 ufc/g (Dušková *et al.*, 2016 ; Vasilopoulos *et al.*, 2010). La fraction de bactéries résistant à la cuisson n'est pas encore clairement connue à ce jour. La difficulté à identifier ces bactéries réside dans le fait que certaines bactéries ayant subi un choc thermique ne se développent pas sur les milieux de croissance habituels juste après cuisson. Or, elles ne sont pas systématiquement inactivées et sont parfois capables de se régénérer. Ainsi, en fonction de leur pouvoir de récupération, certaines ne se développent que plus tard sur le produit. Il est également difficile d'établir des règles générales de résistance à la cuisson en fonction des genres ou espèces bactériennes. Au sein des Firmicutes, il est

établi par exemple que les bactéries du genre *Carnobacterium*, très présentes en fin de barattage, sont plus sensibles à la cuisson que *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Weissella* (Borch *et al.*, 1988 ; Franz et von Holy, 1996 ; Peirson *et al.*, 2003) et sont généralement inactivées (Samelis *et al.*, 1998). Or, si les *Leuconostoc* sont globalement moins sensibles à la cuisson, tous n'y résistent pas pour autant. Samelis (1998) a montré que *L. mesenteroides* était présent sur la viande crue mais était inactivé par la cuisson des jambons. Il semblerait que la capacité à résister à des températures de pasteurisation (telle que celle utilisée pour la cuisson) soit spécifique à certaines souches, qualifiées de thermoduriques. Par exemple, Björkroth (1998) a retrouvé une même souche de *L. carnosum* sur des jambons avant et après cuisson alors qu'elle n'était pas présente dans l'environnement de production, suggérant ainsi une résistance de cette souche à la cuisson.

Peu d'informations sont disponibles à propos de l'influence du temps de stockage après cuisson (avant le démoulage et le tranchage) sur les communautés microbiennes des jambons. Une augmentation de ce temps de stockage de deux jours n'avait pas d'effet sur celles-ci (Björkroth et Korkeala, 1997).

Les étapes après stockage peuvent ensuite être sources de contamination, comme au niveau de la chambre de démoulage des jambons, où la concentration en bactéries lactiques dans l'air peut être particulièrement élevée (de l'ordre de 120 ufc/m^3) en comparaison avec les autres pièces où les bactéries lactiques ne sont généralement pas détectées (Björkroth et Korkeala, 1997).

Une autre source de contamination majeure après cuisson est l'étape de tranchage. Dušková (2016) a montré qu'après tranchage et emballage, les bactéries lactiques dans le jambon atteignaient 10^3 ufc/g, alors qu'aucune bactérie n'était détectée en sortie de cuisson. Des bactéries présentes sur le produit fini comme *L. carnosum*, *L. gelidum* et *L. sakei* étaient retrouvées en particulier dans la salle de tranchage. Une deuxième étude comparant des jambons tranchés et non tranchés à 60 jours de stockage a révélé que les jambons entiers étaient dominés par *L. carnosum* alors que les jambons tranchés étaient dominés par *L. mesenteroides*, visiblement apporté par le tranchage et prévalant sur

L. carnosum (Samelis *et al.*, 2006). Le procédé de production de produits crus comme les saucisses inclut également une étape de tranchage qui affecte de façon similaire les communautés bactériennes du produit fini. Borch *et al* (1988) a comparé la charge bactérienne de saucisses tranchées et non tranchées. Après deux jours de stockage, les saucisses non tranchées ne présentaient pas de bactéries lactiques sur milieu de culture MRS, tandis que les saucisses tranchées présentaient 10^6 ufc/g de bactéries lactiques sur ce même milieu.

Les contaminations présentes sur les surfaces de tranchage peuvent être originaires des produits après cuisson. Par exemple lorsque deux lots de jambon sont tranchés successivement sur une même ligne de tranchage, les bactéries présentes sur le premier lot de jambon avant tranchage sont parfois retrouvées sur le deuxième lot après tranchage (Björkroth et Korkeala, 1997). Ce même phénomène de contamination des surfaces par la viande a été observé dans une usine de production de saucisses de porc. Il a été montré que certaines bactéries apportées par la matière première pouvaient particulièrement se développer sur les surfaces de travail. C'est par exemple le cas de *Yersinia* (Hultman *et al.*, 2015 ; voir Figure 10) ou de *B. thermosphacta* (Dušková *et al.*, 2016), originaires de la viande de porc crue et dont la croissance est favorisée par l'exposition à l'air ambiant.

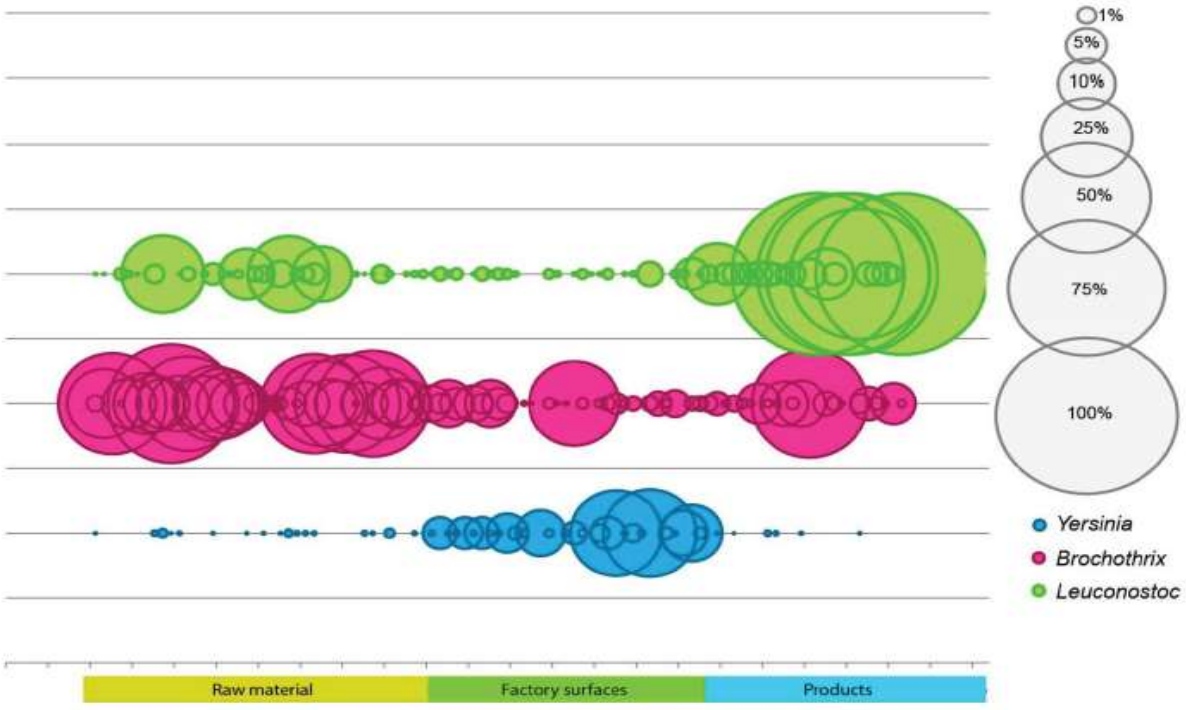


Figure 10 : Abondance relative des bactéries du genre Leuconostoc, Yersinia et Brochothrix sur la matière première, les plans de travail et les saucisses cuites.

Extrait de Hultman (2015).

Les surfaces de tranchage peuvent également être contaminées par d'autres bactéries que celles de la viande. Björkroth et Korkeala (1997b) ont montré que les surfaces où étaient tranchés des

jambons présentaient une souche de *L. carnosum*, retrouvée par la suite sur le produit fini, mais absente de la matière première. En effet, il existe d'autres sources de contamination que la viande crue, telles que les mains des opérateurs (Björkroth et Korkeala, 1997) ou encore les eaux de nettoyage. Dans une usine de production de poulet, Vihavainen (2007) a par exemple constaté que l'air et les surfaces de production présentaient des bactéries lactiques comme *C. divergens* ou *Leuconostoc gasicomitatum,* retrouvées sur le produit en fin de stockage sous atmosphère modifiée mais absentes dans la viande crue. De même, dans une usine de fabrication de saucisses de porc, la proportion de *Leuconostoc*, de *Yersinia* et de *Clostridium* était plus importante sur les surfaces de travail juste après nettoyage qu'en cours de production (Hultman *et al.*, 2015) suggérant une contamination par les eaux de lavage.

Parmi les bactéries présentes sur les surfaces, certaines sont même capables de former des biofilms résistant aux procédures de nettoyage (pour une revue, voir Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019). Par exemple, *S. proteamaculans* est capable de former des biofilms avec *L. monocytogenes,* du fait de sa forte tolérance à la dessiccation et de sa capacité à produire des polysaccharides de glucose, permettant l'adhésion à l'acier inoxydable (Daneshvar Alavi et Truelstrup Hansen, 2013). Les *Leuconostoc* comme *Leuconostoc citreum, L. mesenteroides* (Leathers et Bischoff, 2011) ou *L. gelidum* subsp. *gasicomitatum* (Pothakos *et al.*, 2015a) sont également connus pour leur capacité à former des biofilms. Ils produisent du dextrane extracellulaire qui favorise leur adhérence aux surfaces (Du *et al.*, 2019 ; Feng *et al.*, 2018 ; Llamas-Arriba *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2018).

Si dans le cas du jambon, les bactéries résidentes sur les surfaces de production sont généralement non désirées, celles-ci peuvent avoir un rôle essentiel dans la production d'autres produits comme les saucisses traditionnelles sans ferment ajouté telles que le Chorizo de León. Quijada (2018) a montré dans son étude qu'au cours de la production, des bactéries telles que *Lactobacillus* et *Staphylococcus* contaminant les saucisses étaient essentielles au développement de la couleur et de la flaveur.

Enfin, l'étape d'emballage ne semble pas être une source de contamination majeure. Mol (1971) a montré que la contamination du jambon au moment de l'emballage était négligeable par rapport à celle liée au tranchage.

Globalement, on remarque que les bactéries à Gram-négatif sont omniprésentes dans la viande fraîche, tandis qu'elles ne sont que peu présentes dans les produits transformés.

1.2.3 Evolution des communautés pendant le stockage

1.2.3.1 La charge bactérienne augmente au cours du stockage

Pendant le stockage, l'augmentation du nombre de bactéries est associée à un phénomène de croissance bactérienne. Le terme de croissance bactérienne englobe à la fois l'augmentation du nombre de cellules (divisions cellulaires) et l'augmentation du volume cellulaire.

Une façon simple d'estimer le nombre de cellules vivantes cultivables, à savoir la charge bactérienne dans un échantillon, est le dénombrement. Il s'agit d'estimer le nombre de colonies bactériennes formées sur un milieu de croissance non sélectif à partir d'un inoculum de cet échantillon. Cette estimation suppose que chaque bactérie isolée est à l'origine de la formation d'une colonie, d'où le terme de ufc (Colony Forming Unit / Unité Formant Colonie). Cette estimation est valable si les cellules sont disjointes, et si l'inoculum est suffisamment dilué pour que les colonies bactériennes soient distinguables.

1.2.3.2 La diversité bactérienne chute au cours du stockage

En sortie de production, la viande (cuite ou crue) arbore une diversité de contaminants, correspondant principalement aux phyla des Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes et Actinobacteria (Chaillou *et al.*, 2015 ; De Filippis *et al.*, 2013 ; Raimondi *et al.*, 2018 ; Zhao *et al.*, 2015).

Toutes les études de métagénétique s'accordent pour dire que la diversité diminue au cours du stockage. Elle a été estimée au début du stockage sur différentes viandes (bœuf, porc, veau, volaille)

à plus de 200 OTUs et chute en fin de stockage à DLC, ou à l'altération à environ 20 OTUs (Benson *et al.*, 2014 ; Chaillou *et al.*, 2015 ; De Filippis *et al.*, 2013 ; Ercolini *et al.*, 2011 ; Fougy *et al.*, 2016 ; Hultman *et al.*, 2015 ; Lauritsen *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2019 ; Nieminen *et al.*, 2012 ; Quijada *et al.*, 2018 ; Raimondi *et al.*, 2018 ; Säde *et al.*, 2017).

En comparant les communautés microbiennes initiales de différents produits carnés et de la mer, Chaillou (2015) a observé qu'un noyau d'espèces était commun à tous les produits (voir Figure 11), qu'un noyau d'espèces était typique des produits carnés, et que d'autres espèces étaient spécifiques d'un type de produit (par exemple, spécifiques des dés de lardons). Au cours du stockage, la croissance de ces espèces (et particulièrement de celles issues du noyau d'espèces initial) est favorisée dans certains types de produits. Ainsi, les communautés bactériennes sont de plus en plus différentes selon les produits au cours du stockage. Par exemple, *P. acnes* a été retrouvé spécifiquement dans les filets de saumon altérés alors qu'il appartenait au noyau d'espèces initialement commun à tous les échantillons.

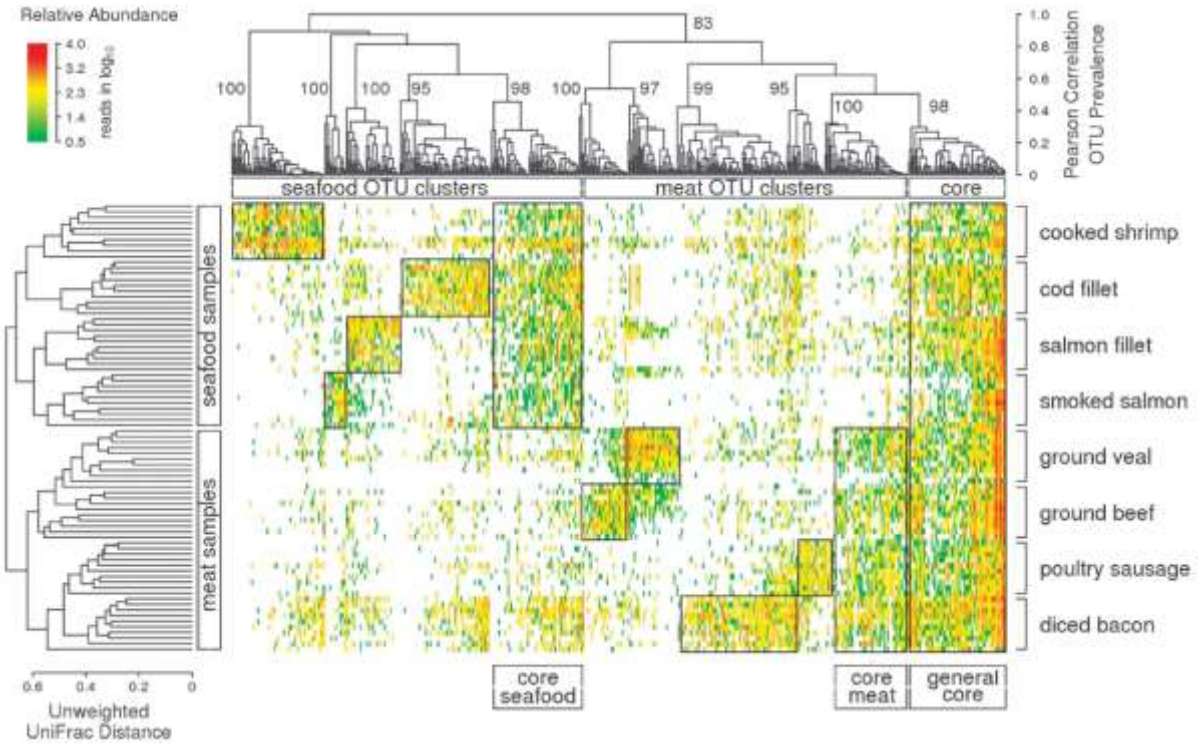


Figure 11 : Heatmap montrant l'abondance relative d'OTUs dans des échantillons frais (T_0).

Les échantillons sont triés sur la base de leur distance UniFrac non pondérée et les OTUs sont regroupées sur la base de leur prévalence dans les échantillons à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson. (Extrait de Chaillou et al., 2015).

1.2.4 Les bactéries présentes à DLC ou à l'altération correspondent à la fraction ayant résisté aux technologies de barrière

Selon le type de produit, différentes technologies sont utilisées pour limiter la croissance bactérienne, telles que la cuisson, le stockage réfrigéré, la congélation, le séchage, le salage, l'ajout de conservateurs, l'acidification, le fumage, le retrait de l'oxygène ou encore l'ajout de souches de biopréservation. Ces technologies dites de barrière (Leistner, 1992) sont utilisées, seules ou en combinaison, et reposent souvent sur des paramètres comme la température (cuisson, réfrigération), le pH, le potentiel redox, la disponibilité en eau (a_w), la disponibilité en O_2, l'ajout d'ingrédients de conservation ou d'additifs, ou encore le phénomène de compétition bactérienne. Leistner (1992) a illustré le concept de technologies de barrière par une population bactérienne initiale dont une

fraction, de plus en plus minime, survit aux barrières successives. Ainsi, si différentes barrières sont mises en place, différentes communautés bactériennes sont sélectionnées.

Dans la Figure 12, nous nous sommes inspirés du concept de Leistner pour proposer une illustration schématique des principales technologies de barrière pouvant être appliquées au jambon cuit.

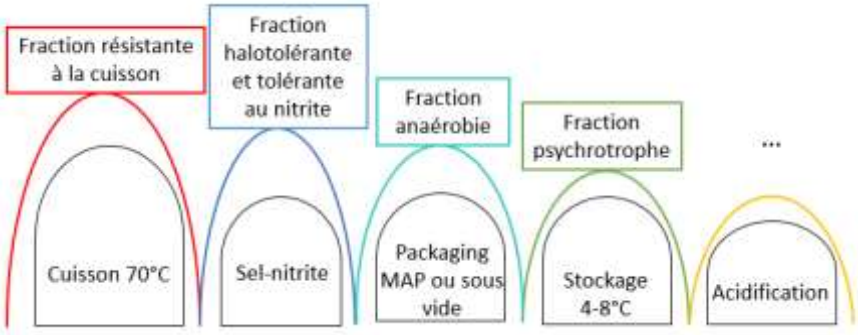


Figure 12 : Illustration schématique de l'effet sélectif des différentes technologies de barrière sur les bactéries du jambon cuit.

1.2.4.1 Sélection des bactéries en fonction du type d'emballage

Le type d'emballage est un facteur primordial de sélection. La longe de porc, si elle est stockée en barquettes à l'air libre présente un développement de *Pseudomonas* et *B. thermosphacta* (Li *et al.*, 2006). La viande de bœuf, si elle est stockée en aérobiose, présente majoritairement des *Pseudomonas*, *B. thermosphacta, Acinetobacter, Psychrobacter*, *Staphylococcus* et des *Enterobacteriaceae* (De Filippis *et al.*, 2013). Ces bactéries (*Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Staphylococcus*) sont connues pour se développer particulièrement en présence d'O_2. Parmi les *Pseudomonas* retrouvés dans la viande qui est un milieu riche en fer, *Pseudomas fragi* est l'espèce dominante. Cette espèce est capable d'utiliser diverses sources de fer et semble particulièrement adaptée au milieu viande (Champomier-Vergès *et al.*, 1996 ; Labadie, 1999). Ces mêmes bactéries ne se développent que peu dans le bœuf, le veau, la volaille ou les dés de lardon stockés sous atmosphère protectrice avec des taux de CO_2 élevés.

Un stockage de la viande sous vide favorise la croissance des *Lactobacillaceae*, avec une prévalence de *Lactobacillus* et *Lactococcus* dans la viande de bœuf crue (Jääskeläinen *et al.*, 2016), de *Lactobacillaceae* dans la viande de porc crue (Li *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2015), et de *L. sakei* et *L. fuchuensis* dans le carpaccio de bœuf (Lucquin *et al.*, 2012).

Pour un même type d'emballage, la perméabilité à l'O_2 est un paramètre susceptible de modifier les communautés microbiennes. Kotzekidou (1996) a testé l'effet de deux emballages sous vide avec des perméabilités différentes à l'O_2 (360 et 77 cm^3/m^2/jour/atm). Il a montré que ce paramètre pouvait influencer significativement la durée de vie d'un jambon classique, tandis qu'aucun effet de l'emballage n'était constaté pour des jambons auxquels une culture protectrice de *Lactobacillus alimentarius* avait été ajoutée avant cuisson. Ainsi, l'effet « perméabilité de l'emballage à l'O_2 » est dépendant de la communauté bactérienne initiale.

Différents emballages sous atmosphère modifiée avec des niveaux variables de CO_2, N_2 et O_2 existent et peuvent avoir des effets différents sur les communautés. Nieminen et ses collaborateurs (2015) ont inoculé de la viande de porc crue avec 14 bactéries lactiques fréquemment isolées d'échantillons de viande et ont testé leur dynamique sous quatre atmosphères protectrices différentes. Ils en ont conclu qu'une forte concentration en CO_2 favorisait la croissance de *Lactobacillus*, qu'une forte concentration en O_2 favorisait la croissance de *Leuconostoc* et qu'un emballage sous atmosphère modifiée (80 % N_2 : 20 % CO_2) favorisait la croissance de *Lactococcus*. D'après Jääskeläinen *et al.* (2016), la viande de bœuf crue sous atmosphère modifiée (80 % O_2/20 % CO_2) est dominée par *Leuconostoc*, en accord avec l'O_2 favorisant sa croissance.

1.2.4.2 Sélection des bactéries en fonction de la température de stockage

Adenauert (2010) a montré que la charge en bactéries lactiques cultivables était plus importante à 20 °C qu'à 37 °C, montrant ainsi qu'une fraction de ces bactéries est psychrotrophe, c'est-à-dire capable de survivre à des basses températures, jusqu'à -5 °C et ayant une température optimale de croissance à 25 °C. Par ailleurs, sur les produits carnés, une fraction des bactéries initialement

présentes telles que des espèces du genre *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* ou *Leuconostoc*, résiste à un stockage à basses températures. Ces bactéries sont principalement d'origine environnementale (Chaillou *et al.*, 2015).

Selon la température de stockage, différents groupes bactériens se développent. Après 45 jours de stockage, la charge en bactéries lactiques sur du jambon est plus importante à 8 °C qu'à 4 °C (Kalschne *et al.*, 2015). Vasilopoulos et ses collaborateurs (2008) ont montré une prévalence de *L. carnosum* et de *B. thermosphacta* sur des jambons à de faibles températures (entre 4 et 12 °C), une prévalence d'*Enterococcus* à des températures plus élevées (26 °C) et une prévalence de *C. divergens* à toutes les températures testées.

Comi et ses collaborateurs (2012) ont comparé le temps de génération de *L. carnosum*, *L. mesenteroides*, *L. sakei* et *Weissella viridecens* sur du jambon à 4, 6 et 8 °C. Ils ont montré que le temps de génération de *L. carnosum* était plus court que celui des autres espèces à 4 °C.

L. carnosum est une espèce dominante dans la plupart des échantillons de jambons et semble être une espèce particulièrement adaptée au froid. Des souches de *L. carnosum* différentes ont été retrouvées sur des jambons stockés à 4 ou à 26 °C (Vasilopoulos *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les échantillons contenaient initialement une diversité de souches et que certaines souches se sont préférentiellement développées à une température donnée. Cette étude souligne la capacité d'adaptation de cette espèce à différentes niches écologiques.

1.2.4.3 Sélection des bactéries en fonction des ingrédients ou additifs utilisés

Les ingrédients et les conservateurs incorporés à la viande peuvent être un facteur de sélection des communautés bactériennes des produits carnés. Parmi les composés couramment utilisés pour la conservation des produits carnés, on trouve le sel, le nitrite, le nitrate, le lactate, l'acétate, l'ascorbate ou encore les phosphates (Benson *et al.*, 2014 ; Fougy *et al.*, 2016 ; Geeraerts *et al.*, 2017 ;

Lamkey *et al.*, 1991). Ces composés sont généralement incorporés pour leur effet inhibiteur sur la croissance de bactéries pathogènes ou d'altération.

Par exemple, l'ajout cumulé de sel, nitrite, lactate et di-acétate dans des saucisses de porc inhibe la plupart des bactéries présentes, à l'exception de *L. graminis* et permet une conservation de 90 jours (Benson *et al.*, 2014), contre 21 jours pour des saucisses de porc sans lactate ni di-acétate (Fougy *et al.*, 2016). De façon similaire dans le jambon contenant du sel, du nitrite et du lactate de potassium, *L. sakei* est dominant et *Leuconostoc*, *Carnobacterium* et *B. thermosphacta* sont sous-dominants, tandis que dans les jambons avec uniquement du sel et du nitrite, *Leuconostoc* est dominant, suivi de *Carnobacterium*, *B. thermosphacta* et *L. sakei* (Geeraerts *et al.*, 2017). Ainsi, certains *Lactobacillus* comme *L. graminis* et *L. sakei* semblent particulièrement tolérants aux additifs comparativement aux autres espèces présentes.

Dans les paragraphes suivants, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'activité bactériostatique du sel et du nitrite.

Impact d'une réduction de sel sur la structure des communautés des produits carnés

Les propriétés du sel (NaCl) pour la conservation des aliments sont dues principalement à son pouvoir de rétention d'eau, pouvant causer un stress osmotique bactérien lié à la diminution de l'activité de l'eau (a_w) de l'aliment. Parmi les bactéries les moins tolérantes à un stress osmotique, se trouvent des espèces telles que *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum* et *Pseudomonas fluorescens* dont la croissance n'est possible que pour une a_w supérieure à 0,96-0,98 (voir Table 2). Une telle a_w est obtenue pour une addition de sel de 4% (Doyle et Glass, 2009). Cette teneur est largement supérieure aux concentrations en sel utilisées pour la fabrication du jambon cuit, généralement de l'ordre de 2%.

Table 2 : Activité de l'eau minimale pour la croissance de micro-organismes d'origine alimentaire.

Micro-organisme	Activité de l'eau minimale pour la croissance	Référence
Campylobacter jejuni	0,98	(Doyle et Roman, 1982)
***Clostridium botulinum* B**	0,94	(Ohye et Christian, 1967)
***Clostridium botulinum* E**	0,97	(Ohye et Christian, 1967)
Escherichia coli	0,95	(Marshall *et al.*, 1971)
Listeria monocytogenes	0,92	(Tapia de Daza *et al.*, 1991)
Pseudomonas fluorescens	0,97	(Marshall *et al.*, 1971)
Salmonella sp.	0,95	(Christian, 2000)
Staphylococcus aureus	0,86	(Scott, 1953)
Aspergillus flavus	0,80	(Pitt et Miscamble, 1995)
Saccharomyces cerevisiae	0,90	(Christian, 2000)
Zygosaccharomyces bailii	0,80	(Pitt et Richardson, 1973)

Extrait de Doyle (2009).

Dans une étude récente, Aaslyng et ses collaborateurs (2014) ont comparé l'effet de différentes concentrations en sel sur la croissance de bactéries dans différents produits de charcuterie. Dans cette étude, une réduction de sel de 25 à 50 % n'affectait pas de manière significative la présence des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonas* pour les quatre produits testés (bacon, jambon, salami et saucisse). Ainsi, même à des concentrations en sel élevées, de l'ordre de 10 % pour le bacon, certains *Pseudomonas* peuvent croître. Il a également été montré sur de la viande de porc crue à 0, 1,5 et 3 % de sel que les niveaux de population des *Enterobacteriaceae* étaient les mêmes pour les trois concentrations à 12 jours de stockage, mais que ces niveaux étaient atteints moins rapidement dans les échantillons les plus salés (Duranton *et al.*, 2012). En effet, ces auteurs ont montré que la cinétique de croissance des *Enterobacteriaceae* était ralentie dans les échantillons les plus salés, avec 2 $\log_{10}$ d'écart à six jours de stockage entre les échantillons à 0 et 3 % de sel.

Comme indiqué dans la Table 3, dans le bacon, le jambon, le salami et la saucisse, la croissance des bactéries lactiques n'est pas impactée par un ajout de sel pouvant aller jusqu'à 10 % dans le bacon

(Aaslyng *et al.*, 2014). Dans certains échantillons de jambon, de saucisse et de bacon, des levures ont été détectées. Les auteurs ont noté que leur croissance était plus importante aux teneurs en sel les plus élevées. Ils expliquent ce phénomène par un ralentissement de la croissance des bactéries lactiques à de fortes concentrations en sel, rendant probablement les levures plus compétitives dans une certaine plage de concentrations. Au-delà d'un certain seuil de concentration de sel, de l'ordre de 7,5 à 15 % au pH de la viande (Praphailong et Fleet, 1997) les levures finissent également par être inhibées.

En comparant du poulet, de la dinde et du jambon tranché standard ou à teneurs en sel réduites de 25 à 50 %, Miller *et al.* (2014) ont montré sur la base de la comparaison des index de Simpson et Shannon par des approches culturales et DGGE pour les différents produits que ceux à teneurs en sel réduites présentaient plus de diversité que ceux à teneurs en sel standards. Plus récemment, Fougyet ses collaborateurs (2016) ont comparé la diversité de saucisses de porc standards (2 % de sel) et à teneur en sel réduite (1,5 % de sel) et ont montré que les produits à teneur en sel réduite présentaient moins de diversité que ceux à teneurs en sel standards. En particulier, les bactéries minoritaires étaient plus abondantes dans les échantillons à 2 % de sel. Les divergences entre ces résultats peuvent être liées à des différences de gammes de sel testées ou encore aux méthodes utilisées par Fougy *et al.* (PCR et séquençage d'amplicons du gène *SSU* rRNA), permettant une meilleure détection des espèces minoritaires par rapport à celles utilisées par Miller *et al.*.

Table 3 : Niveaux de population de groupes bactériens en fonction des concentrations en sel dans différents produits carnés.

			Dénombrements (log_{10} ufc/g)								
Produit	Jours de stockage	Gamme de sel	Tot	LAB	Entb	Entc	Sta	Pse	Bth	Lev	Références
Saucisse	29	1%	3,5	4	0	ND	ND	1,5	0	2	Aaslyng *et al.*, 2014
		0,5%	5,5	5,5	0	ND	ND	1	0	0	
		0%	4	3,5	0	ND	ND	1	0	0	
Jambon cuit	28	1,3%	8,5	8,5	3	ND	ND	3,5	3	1,5	
		0,74%	8,5	8	2	ND	ND	3	3,5	0	
		0,18%	8,5	8	1,5	ND	ND	2	3	0	
Bacon	66	10%	8,5	8	0	ND	ND	4	5,5	5	
		5,7%	8,5	8,5	1	ND	ND	4	5,5	4	
		1,4%	8,5	8	1,5	ND	ND	4	5,5	2,5	
Salami	90	3%	0	7,5	0	ND	ND	0	0	0	
		2,25%	0	7	0	ND	ND	0	0	0	
		1.5%	0	4,5	0	ND	ND	0	0	0	
Porc cru	6	3%	6	5	5,5	ND	ND	ND	ND	ND	Duranton *et al.*, 2012
		1,5%	8	5	7,5	ND	ND	ND	ND	ND	
		0%	8,5	7	8	ND	ND	ND	ND	ND	
Porc cru	12	3%	9	7	8	ND	ND	ND	ND	ND	
		1,5%	9	6	8	ND	ND	ND	ND	ND	
		0%	9	7	8,5	ND	ND	ND	ND	ND	
Boudin « Chouriço»	14	6%	7,5	8,5	2,5	1	4,5	ND	ND	4,5	Laranjo *et al.*, 2017
		3%	6,5	8	2	1,5	3	ND	ND	3,5	
Boudin « Paio »	30	6%	6,5	7	0	1,5	4	ND	ND	5	
		3%	8	9,5	1,5	2,5	3,5	ND	ND	4,4	

Tot : flore totale aérobie mésophile ; LAB : Bactéries lactiques ; Entb : Enterobactéries ; Entc : Entérocoques ; Sta : Staphylocoques ; Pse : Pseudomonas ; Bth : Brochothrix thermosphacta ; Lev : levures ; ND : non déterminé.

Impact d'une réduction de nitrite (ou nitrate) sur les micro-organismes des produits carnés

Comparativement à l'effet du sel sur le développement bactérien, l'effet du nitrite a été relativement peu étudié. Si les détails des mécanismes d'action sont peu connus, nous savons que le nitrite est impliqué dans l'inhibition de diverses bactéries en contribuant au stress oxydatif dans les cellules (Majou et Christieans, 2018). En effet, il est à l'origine de la production de l'oxyde nitrique (NO) très réactif. Cette molécule a un rôle de messager central dans le métabolisme (Prolo *et al.*, 2014), mais peut aussi se fixer au fer de l'hème de molécules telles que la myoglobine, la catalase, la

ferrochélatase ou encore l'aconitase et les inactiver (Andersen *et al.*, 1990 ; Stern *et al.*, 2013). Elle peut également réagir avec des peroxydes et produire du peroxynitrite (ONOO-), molécule oxydante très réactive pouvant générer des lésions dans la cellule comme des cassures des brins d'ADN, l'oxydation ou la nitratation des protéines ou lipides (Ferrer-Sueta et Radi, 2009 ; Zingarelli *et al.*, 1996).

Le pH, la présence d'O_2 ou encore la présence de sel ou d'ascorbate peuvent conditionner ces réactions. En conditions acide et anaérobie, l'O_2 n'est plus lié à l'hème de la myoglobine, qui est alors libre pour réagir avec le nitrite et former la nitrosomyoglobine. Cette réaction libère de l'oxyde nitrique. L'ajout d'ascorbate ou de sel peut également influencer la production de composés réactifs et augmenter l'effet antimicrobien, on parle de synergie. Par exemple, l'ascorbate réduit le Fe^{3+} de la metmyoglobine en Fe^{2+} de la déoxymyoglobine. Cette dernière peut alors à nouveau réagir avec le nitrite et former la nitrosomyoglobine et de l'oxyde nitrique (Richards, 2013). Par ailleurs, l'ion Cl^- du sel peut réagir avec l'oxyde nitrique pour former du chlorure de nitrosyle, un puissant agent nitrosant (Devine, 2014).

La plupart des études disponibles s'intéressent à l'effet du nitrite sur la survie de bactéries pathogènes (ou de leurs équivalents non pathogènes) telles que *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ou encore *S. enterica* (Birzele *et al.*, 2005 ; EFSA, 2003 ; Hospital *et al.*, 2016, 2015, 2014, 2012 ; Keto-Timonen *et al.*, 2012 ; Majou et Christieans, 2018 ; Redondo-Solano *et al.*, 2013). *C. botulinum* survit au traitement thermique dans les produits carnés sous forme de spores (Keto-Timonen *et al.*, 2012). A cinq semaines de stockage à 8°C, dans la saucisse et le jambon cuit, préparés sans nitrite ou avec 75 ou 120 mg/kg de nitrite, *C. botulinum* a été détecté par dénombrement à toutes les concentrations et à des niveaux plus élevés dans les échantillons sans nitrite. A ce même temps d'analyse, aucune production de toxine n'a été détectée avec 75 ou 120 mg/kg de nitrite, tandis qu'elle a été détectée dans les échantillons sans nitrite. Dans des saucissons inoculés avec *Salmonella*, Hospital et ses collègues (2014) ont montré que la

croissance était minimisée dans des échantillons dès 75/75 mg/kg de nitrate/nitrite, mais que ce pathogène n'était pas complètement éliminé même à 150/150 mg/kg de nitrate/nitrite. Enfin, Hospital et ses collègues (2012) ont montré que dans des saucissons avec 0/0, 75/75, 112,5/112,5 ou 150/150 mg/kg de nitrate/nitrite, des concentrations de 120/120 mg/kg de nitrate/nitrite étaient nécessaires pour éliminer *Listeria* à 90 jours de stockage.

Quelques études se sont intéressées à la survie des ferments utilisés pour la fabrication du saucisson, tels que *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus camosum*. Ces deux espèces sont partiellement inhibées par des concentrations en nitrite supérieures à 75/75 mg/kg de nitrate/nitrite (Hospital *et al.*, 2014, 2012). Il a récemment été montré qu'une souche de *S. xylosus* avait une croissance similaire en présence de nitrite ou non. Cette souche était capable de surexprimer des gènes de résistance à un stress nitrosant comme ceux impliqués dans l'homéostasie du fer ou dans la production d'enzymes antioxydantes (Vermassen *et al.*, 2014).

Peu d'études sont disponibles sur l'effet du nitrite sur les bactéries d'altération (voir Table 4). La croissance des bactéries lactiques (Hospital *et al.*, 2016, 2015, 2014, 2012), des *Enterobacteriaceae* (Hospital *et al.*, 2015, 2012) et de *B. thermosphacta* (Hospital *et al.*, 2014) dans des saucissons avec 0/0, 75/75, 112,5/112,5 et 150/150 mg/kg de nitrate/nitrite a été comparée. Les auteurs ont montré que la croissance des bactéries lactiques n'était pas affectée par la concentration en nitrate/nitrite, tandis que celle des *Enterobacteriaceae* et de *B. thermosphacta* était réduite aux concentrations en sel les plus importantes. Cardinali *et al*. (2018) a observé ce même comportement des bactéries lactiques et des *Enterobacteriaceae* en comparant des saucisses à différentes concentrations en nitrate/nitrite (150/125 ; 75/60 et 0/0 mg/kg). Dans cette même étude, la croissance des *Pseudomonas* était également inhibée à partir de 75/60 mg/kg de nitrate/nitrite. Il a été montré dans des saucissons à 250, 212,5 et 187,5 mg/kg de nitrate que les levures pouvaient également être affectées par les concentrations en nitrate. Dans les échantillons testés, la croissance des levures était plus importante aux faibles concentrations en nitrate (Perea-Sanz *et al.*, 2018).

Table 4 : Niveaux de population de groupes bactériens en fonction des concentrations en nitrate/nitrite dans différents produits carnés.

			Dénombrements (log_{10} ufc/g)							
Produit	Jours de stockage	Gamme de nitrate/nitrite (mg/kg)	Tot	LAB	Entb	Coq	Bth	Lis	Lev	Références
Saucisson	30	150/150	ND	9	0	4,5[a]	ND	2,5[d]	ND	Hospital, 2012
		112,5/112,5	ND	9	1	4,5[a]	ND	4[d]	ND	
		75 / 75	ND	9	1	5,5[a]	ND	4[d]	ND	
		0/0	ND	9	2	6,5[a]	ND	4,5[d]	ND	
Saucisson	5	150/150	7,5	8,5	ND	4,5[a]	5,5	ND	ND	Hospital, 2014
	55	112,5/112,5	7,5	8,5	ND	5[a]	5,5	ND	ND	
		75 / 75	8	8,5	ND	5[a]	5,5	ND	ND	
		0/0	8,5	8,5	ND	6[a]	6	ND	ND	
Chorizo	27	150/150	ND	9	0	5[a]	ND	ND	ND	Hospital, 2015
		112,5/112,5	ND	9	1	5[a]	ND	ND	ND	
		75 / 75	ND	9	1	5,5[a]	ND	ND	ND	
		0/0	ND	9	2	6,5[a]	ND	ND	ND	
Saucisses	7	150/125	ND	8	4,5	5[b]	ND	ND	ND	Cardinali, 2018
		75/60	ND	8	5,5	5[b]	ND	ND	ND	
		0/0	ND	8	6	5[b]	ND	ND	ND	
	42	150/125	ND	8	1	6,5[b]	ND	ND	ND	
		75/60	ND	7,5	3	5[b]	ND	ND	ND	
		0/0	ND	7,5	4	6[b]	ND	ND	ND	
Saucisson	62	250/0	9	7	2,5	4,5[c]	ND	ND	3,5	Perea-Sanz, 2018
		212,5/0	9	7	2,5	4,5[c]	ND	ND	3	
		187,5/0	9	7	2,5	4,5[c]	ND	ND	2,5	

[a] : coques à Gram-positif catalase positive ; [b] : coques coagulase négative ; [c] : coques à Gram-positif ; [d] : Listeria inocua (suivi après inoculation)

Tot : flore totale aérobie mésophile ; LAB : Bactéries lactiques ; Entb : Enterobactéries ; Coq : coques ; Bth : Brochothrix thermosphacta ; Lis : Listeria ; Lev : levures ; ND : non déterminé.

Il peut être noté au regard de ces études que globalement, l'effet d'une réduction de sel et d'une réduction de nitrite à l'échelle des communautés microbiennes est peu connu.

Technologies de barrière additionnelles

D'autres technologies de barrière ont été investiguées. A la différence des produits fermentés, le jambon ne contient pas de ferments limitant la croissance de bactéries indésirables. Il est possible d'ajouter des souches bactériennes bioprotectrices entrant en compétition avec des pathogènes ou

des bactéries d'altération. Par exemple, des études ont testé la capacité de différentes souches de bactéries lactiques à limiter la croissance de pathogènes comme *L. monocytogenes* (Bredholt *et al.*, 1999 ; Hugas *et al.*, 1998 ; Mataragas *et al.*, 2003), de bactéries d'altération comme *B. thermosphacta* ou de bactéries du genre *Pseudomonas* (Kotzekidou et Bloukas, 1996 ; Metaxopoulos *et al.*, 2002 ; Vermeiren *et al.*, 2006).

Par exemple, Vermeiren et ses collègues (2006) ont reporté que lorsque *B. thermosphacta* était inoculé à 10^2 ufc/g sur un jambon modèle en co-culture avec *L. sakei* 10A inoculé à 10^5 ufc/g, la croissance de *B. thermosphacta* était ralentie en comparaison avec la croissance de cette même souche en monoculture.

Une autre technologie de barrière possible pour prolonger la durée de vie du produit est l'ajout d'une étape de traitement haute pression après tranchage et emballage (Duranton *et al.*, 2012 ; Han *et al.*, 2011 ; Vercammen *et al.*, 2011). Un traitement du jambon à une pression de 600 MPa élimine la majorité des bactéries lactiques et sélectionne les plus résistantes telles que *W. viridescens* et *L. mesenteroides* (Han *et al.*, 2011). Ce traitement a des répercussions en matière de qualité du produit : sans traitement haute pression, une diminution de pH est visible dès le premier jour, tandis que si le jambon est traité à 600 MPa, le pH ne chute pas avant 30 jours de stockage sous vide à 7 °C.

Cependant, un traitement haute pression est susceptible d'induire la germination de bactéries d'altération et pathogènes sporulées du genre *Bacillus* ou *Clostridium*. Pour contrôler la croissance éventuelle de ces bactéries, il est possible de combiner un traitement haute pression avec l'ajout de souches bioprotectices. Dans une étude récente sur des dés de jambon (Ramaroson *et al.*, 2018), 63 souches ont été investiguées pour leur capacité à inhiber le développement de ces bactéries et pour leur capacité à résister aux hautes pressions (400, 500 et 600 MPa). Parmi ces souches, une souche de *Lactobacillus curvatus* et une souche de *Lactococcus lactis* ont été pré-sélectionnées pour leur large spectre d'inhibition. Seule *L. lactis* CH-HP15, montrant une reprise de croissance après

traitement haute pression, a été proposée comme souche candidate potentielle de bioprotection sur des dés de jambons traités aux hautes pressions.

Finalement, le microbiote des produits carnés est variable en fonction de la matière première utilisée, de l'environnement de production, de la période de prélèvement ou encore des technologies de barrière mises en place. Cette variabilité est particulièrement marquée dans le cas de produits transformés comme le jambon, pour lesquels chaque étape de production est susceptible de modifier les équilibres microbiens existants malgré un procédé de production standardisé. Or, ces communautés microbiennes peuvent potentiellement conduire à différents profils d'altération.

1.3 COMMUNAUTES BACTERIENNES ET ALTERATION DES PRODUITS CARNES

Nous avons vu précédemment (dans la partie 1.1.4.1 *Défauts sensoriels*) que l'altération correspondait à des défauts visuels, olfactifs et/ou gustatifs apparaissant au cours du stockage, et conduisant à un refus du produit par les consommateurs (Gram *et al.*, 2002). Dans les produits carnés, elle résulte principalement d'activités bactériennes (Doyle, 2010). Au cours de leur croissance, les bactéries produisent des métabolites dont l'accumulation peut altérer le jambon et plus généralement les produits carnés (pour une revue, voir Casaburi *et al.*, 2015).

Des levures peuvent également être détectées dans les produits carnés en fin de stockage, mais il s'agit de contaminants mineurs ne dépassant généralement pas 10^4 ufc/g à la DLC (Nielsen *et al.*, 2008; Raimondi *et al.*, 2019; Vasilopoulos *et al.*, 2010). Etant donnée leur faible vitesse de croissance dans la viande dans les conditions de stockage réfrigéré généralement sous vide ou sous atmosphère protectrice, elles ne sont pas considérées comme une composante majeure de l'altération en conditions standards (Doyle, 2010).

1.3.1 Recherche de corrélations entre la prévalence de taxons donnés et l'altération de produits carnés

L'implication de bactéries dans l'altération est généralement recherchée sur la base de corrélations entre la présence de taxons bactériens dans une communauté bactérienne donnée et la production de métabolites d'altération.

1.3.1.1 Mesure de l'état d'altération

Les indicateurs d'altération utilisés peuvent être un dégagement gazeux, un changement de pH, un changement de couleur ou encore la production de diverses molécules d'altération. Pour mesurer le degré et le type d'altération d'un produit, les études ont généralement recours à des analyses sensorielles (Fougy *et al.*, 2016 ; Raimondi *et al.*, 2019, 2018), à la chromatographie en phase liquide à haute performance (Argyri *et al.*, 2011 ; Raimondi *et al.*, 2018 ; Vasilopoulos *et al.*, 2008), à la GC-MS, chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (Ferrocino *et al.*, 2018 ; Leroy *et al.*, 2009 ; Raimondi *et al.*, 2019, 2018), à des analyses à l'aide d'un nez électronique (GC-MS couplée à des descripteurs sensoriels ; Benson *et al.*, 2014 ; Godziszewska *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2018) ou encore à des dosages ciblés de molécules de type dosage enzymatique (Borch 1989). Plus rarement, le degré de dégradation des protéines peut être caractérisé en mesurant l'azote total volatil basique (Huang *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2019 ; Tian *et al.*, 2017).

Casaburi et ses collègues (2015) ont inventorié les principaux composés volatils associés à des descripteurs d'altération dans la viande crue. Ce sont majoritairement des alcools, des aldéhydes, des cétones, des acides gras, des esters et des composés soufrés (voir Figure 13). Lorsque ces productions sont spécifiquement associées à la prévalence de bactéries, des hypothèses sur l'implication de bactéries dans l'altération peuvent être proposées.

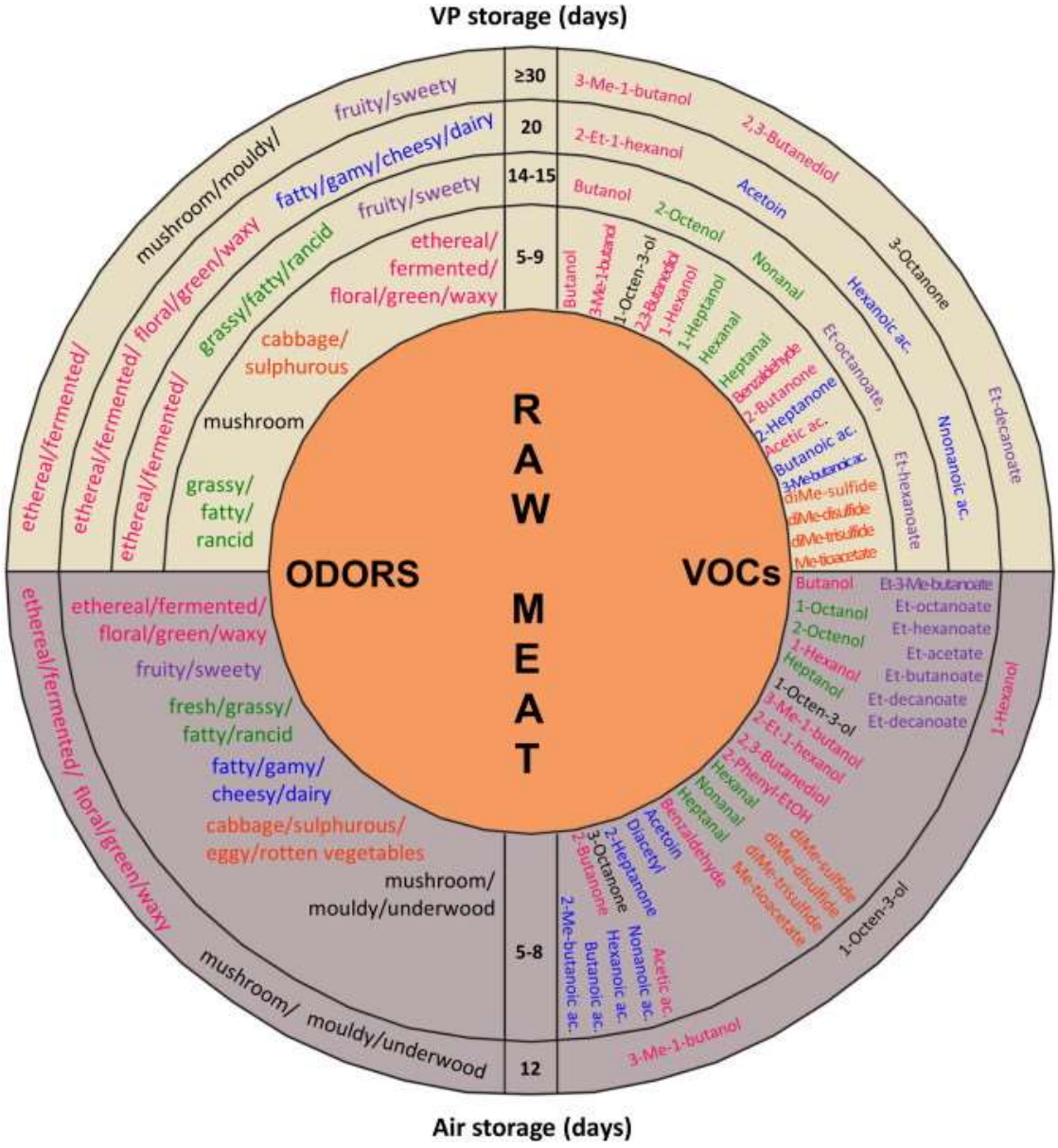


Figure 13 : Synthèse des différents métabolites d'altération détectés dans la viande crue stockée sous vide ou à l'air libre.

(D'après Casaburi, 2015)

1.3.1.2 Identification de bactéries altérantes potentielles

Remenant *et al.* (2015) ont fait l'inventaire des bactéries associées à l'altération dans les aliments et Pothakos et ses collègues (2015c) ont recensé plus particulièrement au sein des bactéries lactiques celles qui étaient associées à l'altération dans les produits carnés. De ces études, il ressort que les

bactéries fréquemment corrélées à l'altération sont généralement les bactéries dominantes en fin de stockage.

Parmi les bactéries à Gram-positif les plus souvent corrélées à l'altération des produits carnés, on trouve les bactéries du genre *Brochothrix* et des bactéries lactiques du genre *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* et *Weissella*. Les bactéries du genre *Brochothrix* sont fréquemment associées à une forte production de composés volatils d'altération. C'est le cas par exemple de *Brochothrix thermosphacta* dans la volaille stockée à l'air libre (Liang *et al.*, 2012) et de *Brochothix campestris* sur de la viande d'agneau sous vide, dont la présence est corrélée également à la production d'exsudat verdâtre (Gribble et Brightwell, 2013). *L. carnosum*, *L. mesenteroides* ou *W. viridescens* ont été associées dans du jambon cuit, dans de la dinde cuite ou dans des saucisses de porc crues à des défauts d'altération de type dégagement gazeux (production de CO_2), odeur acide ou encore verdissement (Comi et Iacumin, 2012 ; Fougy *et al.*, 2016 ; Han *et al.*, 2011 ; Samelis *et al.*, 2000). Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont également associées à une forte production de composés volatils et à des odeurs acides comme c'est le cas pour *L. sakei* dans les filets de dinde sous vide (Samelis *et al.*, 2000) ou encore de *L. graminis* et *Lactobacillus algidus* dans des saucisses de porc (Benson *et al.*, 2014 ; Fougy *et al.*, 2016). Les bactéries du genre *Camobacterium* telles que *C. divergens* ou *C. maltaromaticum* sont associées à l'altération de filets de poulet à l'air libre (Liang *et al.*, 2012) ou de saucisses de porc (Benson *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'implication de certaines bactéries lactiques dans l'altération est controversée car des souches de *L. sakei*, de *L. carnosum* et *C. divergens* peuvent être utilisées en biopréservation (Chaillou *et al.*, 2014 ; Jacobsen *et al.*, 2003 ; Maia Danielski *et al.*, 2017 ; Ramaroson *et al.*, 2018 ; Vermeiren *et al.*, 2006).

Parmi les bactéries à Gram-négatif, les *Pseudomonas* (généralement *P. fragi* et *P. fluorescens*) et les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont fréquemment associées à l'altération des produits carnés. La prévalence de *Pseudomonas* est souvent constatée dans des aliments stockés à l'air libre. L'activité protéolytique des *Pseudomonas* a été mise en évidence dans du bœuf (Ercolini *et*

al., 2011) et la production de biosurfactants dans la viande de poulet (permettant d'augmenter l'accessibilité aux lipides et augmentant l'activité lipolytique) est impliquée dans l'altération (Mellor *et al.*, 2011). La production d'amines biogènes par différentes espèces d'*Enterobacteriales* telles que *Serratia liquefasciens*, *Hafnia alvei* et *Rahnella aquatilis* a été mise en évidence dans des saucisses de porc (Lorenzo *et al.*, 2010). Ces auteurs ont remarqué que la production de cadavérine et de putrescine était particulièrement importante en phase exponentielle de croissance. La prévalence de *Rahnella* sp. et *R. aqualitis* sur de la viande de bœuf altérée stockée à l'air libre a également été mise en évidence (Ercolini *et al.*, 2006).

1.3.2 Complexité à établir un lien de causalité sur la base de ces corrélations

Sur la base de ces corrélations, de nombreuses bactéries ont été identifiées comme des bactéries d'altération. Cependant, relativement peu d'études ont prouvé que ces bactéries étaient réellement altérantes en les ré-inoculant sur un modèle de viande (challenge test) pour reproduire l'altération. C'est le cas par exemple d'une souche de *L. gasicomitatum* dont l'inoculation sur du bœuf stocké sous atmosphère modifiée a reproduit la production de gaz, d'exsudat, le verdissement et le développement d'odeurs acides et de beurre (Johansson *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'identification de bactéries d'altération est d'autant plus complexe que la production de métabolites d'altération peut résulter d'interactions entre plusieurs bactéries. Il a par exemple été montré dans le saumon fumé que la production de putrescine, résultait de la dégradation de l'arginine en citrulline puis en ornithine par *Carnobacterium* sp. ou *L. sakei*, suivie de la dégradation de l'ornithine en putrescine par *S. proteamaculans* ou *H. alvei* (Jørgensen *et al.*, 2000).

De plus, l'altération peut être conditionnée par des facteurs environnementaux. En effet, la présence d'espèces dans un environnement donné ne signifie pas forcément que ces espèces sont métaboliquement actives. Les bactéries ont des génomes qui représentent des potentialités de

fonctions et qui peuvent être exprimées différentiellement selon l'état physiologique de la cellule et les conditions environnementales telles que la nature du substrat ou la disponibilité de l'O_2.

En comparant le potentiel altérant de différentes souches de *B. thermosphacta* dans du jus de bœuf et du jus de crevette, Illikoud et ses collaborateurs (2019a) ont observé que la production d'acétoïne et de diacétyle, composés d'altération caractérisés par une odeur de beurre, était plus importante dans du jus de bœuf que dans du jus de crevette après 48 h de stockage, alors que la charge bactérienne de *B. thermosphacta* était plus importante dans le jus de crevette. Cette étude souligne l'importance du milieu de croissance dans la production de composés d'altération. Elle souligne également que la quantité de bactéries n'est pas toujours proportionnelle à la quantité de métabolites d'altération produits.

Une approche de métatranscriptomique basée sur la quantification relative d'expression des gènes d'une communauté microbienne permet d'identifier les espèces métaboliquement actives, mais cette approche est relativement peu utilisée en écologie microbienne des aliments. Elle a été par exemple utilisée pour étudier l'impact de la température et de l'humidité sur des fromages italiens (De Filippis *et al.*, 2016), ou pour étudier les profils d'expression des bactéries du kimchi, met traditionnel coréen composé de piments et de légumes, pendant la fermentation (Jung *et al.*, 2013).

Il est important de noter que la capacité d'altération peut être différente entre les souches. Sur une centaine d'isolats de *L. camosum*, correspondant à 25 souches différentes, seule une souche était impliquée dans l'altération des jambons (Björkroth *et al.*, 1998). De plus, Illikoud *et al.* (2019b) ont montré sur 16 souches de *B. thermospacta* isolées de différents aliments (altérés ou non) et de différents environnements de production que l'intensité de la production de diacétyle et d'acétoïne était souche dépendante.

Ainsi, nous comprenons que les bactéries ne sont pas altérantes en général mais plutôt altérantes dans des conditions physiologiques et environnementales données, c'est pourquoi il est plus approprié de parler de potentiel d'altération.

1.3.3 Etude des potentialités métaboliques des bactéries

Il est nécessaire de vérifier que les bactéries impliquées dans les corrélations possèdent bien le potentiel de production des métabolites d'altération avec lesquels elles sont corrélées. Pour cela, l'estimation des potentialités métaboliques d'une espèce bactérienne s'effectue sur la base des génomes de souches séquencées pour cette espèce. Cette estimation est d'autant plus fiable que le nombre de génomes disponibles pour une espèce donnée est important.

Les études que nous avons précédemment évoquées dans la partie 2.2 de ce chapitre indiquent globalement une dominance des bactéries lactiques dans les produits carnés stockés sous atmosphère modifiée ou sous vide. Dans ce paragraphe, nous nous sommes particulièrement intéressés aux principaux métabolites d'altération issus de leur métabolisme.

Ces bactéries métabolisent préférentiellement des hydrates de carbone comme le glucose ou le ribose disponibles dans la viande (Chaillou *et al.*, 2005 ; Gill, 1983, 1976). En fonction des genres ou espèces de bactéries lactiques, les hydrates de carbone peuvent être métabolisés selon différentes voies (voir Figure 14). En présence d'hexoses comme le glucose, les bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et certains *Lactobacillus* ont un métabolisme homofermentaire. Il consiste en la dégradation du glucose en pyruvate (glycolyse) et conduit à la production de deux molécules de lactate et de deux molécules d'ATP par molécule de glucose (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). En absence de glucose, ces bactéries peuvent avoir un métabolisme mixte conduisant à la production de formate, d'acétate, de CO_2 et d'éthanol en plus du lactate (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996). Dans ce cas, la production de formate par la pyruvate formate lyase est possible en anaérobiose alors qu'elle est inhibée en aérobiose (Snoep *et al.*, 1992).

Les bactéries des genres *Leuconostoc*, *Weissella* et certains *Lactobacillus* ont un métabolisme hétérofermentaire. Il comprend une dégradation du glucose en xylulose-5-phosphate induisant un dégagement de CO_2, puis conduit à une production de lactate et d'éthanol majoritairement et à une production d'acétate générant de l'ATP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

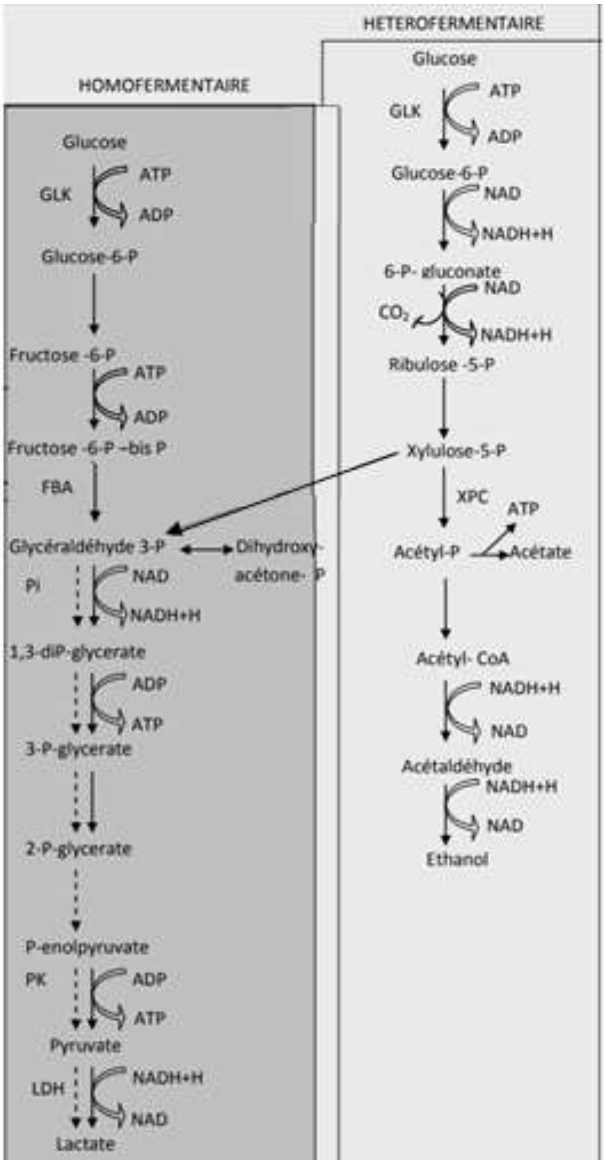


Figure 14 : Voies métaboliques homofermentaire et hétérofermentaire de fermentation du glucose chez les bactéries lactiques.

GLK: gluconase, FBA: fructose-6-bisphosphate aldolase, , XPC: xylulose-6-phosphate phosphocétolase, PK: pyruvate kinase, LDH; lactate déshydrogénase. Extrait de Atlan (2008).

Dans le cas d'utilisation des pentoses tels que le ribose, ils sont métabolisés en xylulose-5-P chez les bactéries homo et hétérofermentaires, qui sont alors capables de produire du lactate, de l'éthanol et de l'acétate.

Enfin, le pyruvate est un intermédiaire clé intervenant dans les trois voies métaboliques précédemment présentées. Il peut également conduire à la production d'autres composés ayant une empreinte olfactive tels que le diacétyle, l'acétoïne, le 2,3-butanediol et l'α-acétolactate (odeur de beurre âcre).

Au regard de la littérature, nous comprenons la difficulté à identifier les bactéries d'altération dans un produit donné du fait de la variabilité des communautés bactériennes des produits carnés, de la variabilité du potentiel d'altération inter et intra-espèce et également de l'implication potentielle de plusieurs espèces dans le processus d'altération.

Nous comprenons aussi que peu de connaissances sont disponibles sur l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur la croissance des différents groupes bactériens et sur l'altération des produits carnés. A ce jour, aucune étude n'a quantifié l'impact d'une réduction de sel et de nitrite à l'échelle des communautés microbiennes. Cette étude permettrait de comprendre les éventuels changements d'équilibres bactériens engendrés par cette réduction et d'identifier les concentrations auxquelles le risque d'altération est augmenté.

RESULTATS

2 CARACTERISATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE JAMBONS ISSUS D'UNE CHAINE DE PRODUCTION INDUSTRIELLE

2.1 CONTEXTE ET OBJECTIF

Au vu de la littérature, nous savons que les communautés microbiennes du jambon cuit sont variables en fonction de nombreux paramètres comme la matière première, les surfaces de production, la disponibilité de l'O_2, les températures de stockage, les conservateurs et/ou les ingrédients utilisés, la période de l'année etc.

Dans cette première étude, notre objectif était de caractériser les communautés microbiennes de jambons produits dans l'usine de l'industriel partenaire, d'identifier les paramètres de production qui les façonnent, et de rechercher d'éventuelles corrélations entre la présence de taxons donnés et la production de métabolites d'altération.

Pour cela, nous avons mis en place un large plan d'échantillonnage (environ 200 échantillons) permettant de tester différentes combinaisons de variables relatives à cinq étapes de production susceptibles de modifier la structure des communautés bactériennes (le mode de transport de la viande crue, le temps de barattage, le temps de stockage après cuisson, la ligne de tranchage et la perméabilité de l'emballage à l'O_2). Cet échantillonnage a été échelonné sur quatre campagnes de prélèvement (sur une durée de six mois). Les communautés ont été caractérisées par une approche globale de métagénétique à l'aide du marqueur moléculaire *gyrB* pour une identification des bactéries au seuil de l'espèce ou intra-espèce. Cette caractérisation a été couplée à une quantification de métabolites indicateurs d'altération par E-Nose et dosages enzymatiques.

Les résultats de ce chapitre sont présentés en deux parties : une première partie sous forme d'un article accepté dans le journal *Food Microbiology* et une deuxième partie comprenant des résultats complémentaires.

2.2 LARGE MICROBIOTA SURVEY REVEALS HOW THE MICROBIAL ECOLOGY OF COOKED HAM IS SHAPED BY DIFFERENT PROCESSING STEPS

Marine Zagdoun[1], Gwendoline Coeuret[1], Méry N'Dione[1], Marie-Christine Champomier-Vergès[1] and Stéphane Chaillou[1,#].

[1]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MIcalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France

[#]Author for correspondence: stephane.chaillou@inra.fr

ABSTRACT

The production of cooked ham involves numerous steps shaping the microbial communities of the final product, with consequences on spoilage metabolites production. To identify the main factors driving the ecology of ham and its spoilage, we designed a study encompassing five variables related to ham production: type of storage during meat transportation, churning speed, drain-off time, slicing line and O_2 packaging permeability. We obtained about 200 samples from the same facility and we characterized *i)* their microbiota based on *gyrB* amplicon sequencing *ii*) their production of spoilage-related metabolites based on E-Nose analysis and enzymatic assays. The slicing was the most critical step, shaping two general types of microbiota according to the slicing line: one dominated by *Carnobacterium divergens* and another one dominated by *Leuconostoc camosum* and *Serratia proteamaculans*. Regarding metabolites production, *L. carnosum* was associated to D-lactic acid, ethanol and acetic acid production, whereas *S. proteamaculans* was associated to acetic acid production. This last species prevailed with highly O_2-permeable packaging. Within a given slicing line, we observed campaign-based variations, with *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Carnobacterium maltaromaticum* prevalent in summer. *L. sakei* was associated with L-lactic acid production and *C. maltaromaticum* with formic and acetic acid production.

INTRODUCTION

The production of cooked ham involves many processing steps, with each being a potential source of bacterial contamination or re-contamination post-cooking. As a consequence, the shelf-life of this meat product is strongly dependent on the microbiota dynamics through these various steps. It is also related with how the process parameters influence the metabolic activities of the growing bacterial species during storage (Audenaert *et al.*, 2010; Dušková *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2011; Piotrowska-Cyplik *et al.,* 2017; Vasilopoulos *et al.*, 2010).

The variability of ham begins at the most upstream step of the process as initial raw pork cuts usually contain diverse microbiota depending on the slaughtering and butchering process (De Filippis *et al.*, 2013; Wheatley *et al.*, 2014). Bacterial contamination usually increases in the processing plants through the contamination of surfaces and equipment (Stellato *et al.*, 2016) along the various processing steps (Hultman *et al.*, 2015; Samelis *et al.*, 1998), as well as with ingredients used in the brine such as spices (Benson *et al.*, 2014). Furthermore, the efficiency of brining depends on churning incubation time, a step which was shown to participate in the selection of some bacterial species, such as *Brochothrix thermosphacta* or *Carnobacterium divergens* (Samelis *et al.*, 1998). After churning, bacterial load is close to 10^5 cfu/g (Dušková *et al.*, 2016; Samelis *et al.*, 1998; Vasilopoulos *et al.*, 2010). The subsequent cooking step at 70°C generally reduces the bacterial load back to practically zero (Dušková *et al.*, 2016; Vasilopoulos *et al.*, 2010). However, some studies showed that thermoduric strains such as *Leuconostoc carnosum* or *Weissella viridescens* could resist cooking (Björkroth *et al.*, 1998; Comi and Iacumin, 2012). Other studies showed that *Leuconostoc mesenteroides* and *L. carnosum* were also brought by the post-cooking downstream processing steps, either through the hands of workers while de-molding, via the slicing machine, the packaging or even via the air (Björkroth and Korkeala, 1997; Dušková *et al.*, 2016; Mol *et al.*, 1971; Samelis *et al.*, 1998). Then, depending on the storage temperatures and the type of packaging used, a final reduction of

bacterial diversity takes place, selecting psychrotrophic anaerobic microbiota (Audenaert *et al.*, 2010; Chaillou *et al.*, 2015), the activity of which will eventually cause spoilage.

Thus, if the microbiota of ham after cooking does probably result of both surviving microbiota after cooking and post-cooking contaminations, it is yet unclear to what extent raw meat and pre-cooking process steps can shape the final microbiota of ham. In this line of view, Geeraerts and co-workers (2017) have nevertheless underlined the variability of bacterial communities of hams between different facilities. They have also shown that those communities can vary depending on the sampling period. Even hams produced within a same facility revealed to harbor variable communities (Audenaert *et al.*, 2010; Vasilopoulos *et al.*, 2010, 2008). More recently, Raimondi and co-workers (2019) described a wide variability in the microbial assemblages of cooked ham from ten different producers in Europe. Despite the low number of ham analyzed in this study (14 different hams in total), their work showed that the quality of hams at the end of the storage period, as measured by organic volatile compounds analysis, was highly dependent on the microbiota present on these products.

Given this complex processing, the spoilage microbial ecology of ham remains difficult to decipher and it is hard for the meat industry to implement useful support decision tool for process management and prevention of food losses. To us, the studies described above represent a revealing illustration of the necessity of adopting a large sampling strategy and robust statistical analysis in order to capture the overwhelming variability created by the many steps of cooked ham processing. The aim of this study was to provide such type of large-scale approach based on a factorial design to allow the analysis of variations within five main processing steps. We focused our analysis on a single processing factory, located in Europe, and by designing a large sampling (over 200 samples), spanning a production period of six months. To improve our accuracy in tracing bacterial taxa throughout processing, we performed *gyrB* amplicon sequencing, a powerful alternative to 16S rRNA gene sequencing for accurate bacterial identification at the intra-species level (Poirier *et al.*, 2018b).

We then combined this diversity analysis with pH measurements and the quantification of five metabolites (ethanol, D- and L-lactate, acetate, formate), used as indicators of fermentation end-products contributing to the pattern of ham spoilage.

MATERIALS AND METHODS

Industrial ham production

Raw pork meat for the production of ham was obtained from a single slaughterhouse. After deboning, raw meat was transported to the ham production factory (see processing step in Table 5). Meat was then brined to reach a final concentration (wt/wt) in the product of 1.4% sodium chloride, 0.5% glucose, 0.08% sodium nitrite, and 0.03% sodium ascorbate. Each sub-batch (determined by variations in processing parameters; see Table 5) was then churned and molded into individual loaves and cooked until the center reached 70°C. After cooking, draining-off, and slicing, hams were packed under 50% CO_2/50% N_2 modified-atmosphere conditions.

Table 5 : Levels of the different processing steps.

Processing step	Description of the step variations	Labeling of levels	Description of the levels analyzed in this study
Meat transportation	Time and storage conditions of the transportation of pork meat from slaughterhouse to the ham factory may vary as a function of meat origin.	Vacuum	Storage in vacuum packaging for ten days at 4°C
		Air	Storage in open air for three days at 4°C
Churning	During ham production, the number of churning rotations is a constant but pause time between two rotation sessions may vary in response to the arrival of meat batches and staff organization.	Quick	Standard quick churning at 4°C, carried out during the workweek
		Slow	Slow churning (four times longer than standard churning) at 4°C, carried out during the weekend
Drain-off	The drain-off time after cooking may be modified in response to production demand.	Long	Drain-off for twelve days at 4°C when production demand is low.
		Short	Drain-off for four days at 4°C when production demand is high.
Slicing line	Several types of slicing lines may be present within a production unit.	Line A	First-generation slicing technology.
		Line B	Second-generation slicing technology (more complex equipment).
O_2 packaging permeability	The film used for sealing the modified atmosphere packaging may vary in its degree of permeability to O_2.	High O_2	Packaging with an O_2 permeability of 16.3 $cm^3.m^{-2}.day.10^5$ Pa.
		Low O_2	Packaging with an O_2 O_2 permeability of 1.24 $cm^3.m^{-2}.day.10^5$ Pa.

Ham storage conditions

Industrial hams were sent to our laboratory immediately after packaging using refrigerated transportation (2 days at 4°C). Hams were stored in FRIOCELL 55 refrigerated incubators (MMM Medcenter, Planegg, Germany) at 4°C for five more days, then at 8°C until the Use-By-Date (UBD) or for 15 more days (past UBD). Control samples (T_0) were immediately frozen at -20°C after packaging and sent frozen to our laboratory. At the end of storage, all ham samples were frozen at -20°C until pH measurement, DNA extraction, and recovery of the microbiota were performed.

Gas and pH measurements

O_2 and CO_2 levels were quantified using an Oxybaby probe (WITTGAS, Morsang-sur-Orge, France). Then, pH was measured using a FiveEasy FE20 surface pH probe (Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, Schwitzerland). The pH data correspond to a mean of five measurements per sample at various areas on the slices.

Identification and relative quantification of volatile organic compounds

Volatile compounds in ham samples were detected with a Heracles II electronic nose (Alpha MOS, Toulouse, France), using ultra-fast gas chromatography. Samples were analyzed on two independent columns of different polarity (nonpolar MXT-5 and medium polar MXT-1701, length 10 m each) for an accurate identification of compounds using their KOVAT number. Agrochembase, an internal database of AlphaMOS, provided information on chemical analysis and sensorial olfactory descriptors.

Microbiota recovery and bacterial load quantification

For each ham sample, four independent bacterial extractions were performed (each of one quarter of a ham) and were subsequently pooled. Our protocol was based on that of Fougy and colleagues (2016), adapted as follows: 20 g of meat were homogenized for 2 x 30 s in a stomacher bag (BagPage, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) with 40 mL of sterile ultrapure water supplemented with 1% Tween 80 (Acros Organics, Waltham, USA). Large meat debris were filtered from the bag and

33 mL of the microbe-containing ham solution was collected. One milliliter was reserved to estimate viable bacterial counts, and the remaining 32 mL were centrifuged at 500 x *g* for 3 min at 4°C (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Villepinte, France) to spin down the remaining meat fibers and debris. A maximum volume of 25 mL of supernatant was then centrifuged at 3000 x *g* for 5 min at 4°C to spin down microbial cells. The supernatant was frozen at -80°C for further metabolite quantification, and the bacterial pellets were washed in 1 mL of sterile ultrapure water, centrifuged at 3000 x *g* for 5 min at 4°C (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Germany), and frozen at -20°C for bacterial DNA extraction. For quantification of the bacterial population, the reserved 1 mL of ham solution was subjected to decimal dilutions and plated on Columbia agar with 5% sheep blood (Thermo Fisher Scientific, Illkirch Graffenstaden, France) in order to estimate the overall cultivable bacterial load. Bacterial colonies were counted after 72 h of incubation at 20°C.

Quantification of end-products

Supernatants of ham samples were clarified to eliminate proteins using the Carrez clarification kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Proteins were precipitated via the successive addition of 600 µL of Carrez reagent I and 600 µL of Carrez reagent II to 5 mL of supernatant. After adjusting the pH to be between 7.5 and 8.5 (required for enzymatic assays), the samples were centrifuged at 5000 x *g* for 20 min to spin down precipitated proteins. Residual proteins were then eliminated by filtration on 0.22-µm high-protein-retention Ministart syringe filters (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). Megazyme enzymatic assays (Megazyme Wicklow, Ireland) were used to quantify concentrations of ethanol (K-ETOH), L- and D-lactic acid (K-LAC), acetic acid (K-ACET), and formic acid (K-FORM), according to the manufacturer's instructions. For all kits, NADH absorbance was measured using a microplate reader (SYNERGY Mx, BIOTEK, Colmar, France).

All calculations of end-product concentrations took into account the dilution factor (20 g of meat in 40 mL of sterile water with 1% Tween 80 for microbiota recovery, and addition of 1.2 mL of Carrez reagents) in order to estimate the real concentrations in meat.

Bacterial DNA extraction and quality control

Bacterial DNA was extracted with a High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics Ltd, Burgess Hill, West Sussex, UK), with the following adaptations: for cellular lysis, bacterial pellets were resuspended in 200 µL PBS that contained lysozyme (final concentration of 20 $mg.mL^{-1}$) and Mutanolysin (12U). This solution was incubated at 37°C for 60 min in a water bath (Polystat 86602, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Then, 200 µL of binding buffer and 40 µL of Proteinase K were added; the solution was vortexed and incubated at 70°C for 30 min in a second water bath (APELEX, JULABO, Seelbach, Germany). DNA was precipitated and purified on columns according to the manufacturer's instructions, with the exception of a reduction of the final elution volume to 100 µL in order to concentrate the DNA. Technical replicates for each ham sample were pooled following DNA extraction and frozen at -20°C. After pooling, double-strand DNA quantification was performed with the Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen, Carlsbad, USA).

PCR protocols for *gyrB* and 16S V3-V4 rRNA gene amplification, purification and quality control of amplicons

The internal fragment of the g*yrB* gene (around 280 bp) was amplified as described by Barret (2015) and Poirier (2018c) with AccuPrime Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) and F64 and R353 degenerated primers (5'-MGNCCNGSNATGTAYATHGG-3' and 5'-CNCCRTGNARDCCDCCNGA-3', respectively). The forward and reverse primers carried the Illumina adapters 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' and 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3', respectively. To balance the high degeneration rate of the primers, the final primer concentration was increased to 1000 nM. PCR was performed on 10 ng of each pooled DNA sample using a PTC-200 thermal cycler (Peltier, BioRad, Hercules, USA). Amplification started with an initial denaturation step of 2 min at 94°C. This was followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 30 s), annealing (55°C for 60 s), and elongation (68°C for 90 s), and ended with a final elongation step of 10 min at 68°C. PCR bias was minimized by pooling three independent PCR replicates per sample.

To assess potential biases in the recovered microbial diversity, controls using 16S V3-V4 rRNA gene amplifications (around 450 bp) were performed on fourteen selected samples; these amplifications used MolTaq 16S DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) and two primers that targeted the V3 and V4 region (Klindworth *et al*., 2013b; Poirier *et al*., 2018b), 5'-ACGGRAGGCWGCAGT-3' and 5'-TACCAGGGTATCTAATCCT-3'. The forward and reverse primers carried the Illumina adapters 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' and 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3', respectively. The final primer concentration was 200 nM. PCR was performed on 10 ng of the pooled DNA sample with a PTC-200 thermal cycler, with the following cycling parameters: initial denaturation for 1 min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (65°C for 60 s), and elongation (72°C for 60 s), and a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR bias was minimized by pooling three independent PCR products per sample.

The *gyrB* and 16S rRNA gene amplicons were purified using a QIAquick kit (Qiagen, Hilden, Germany) and their quality and concentration were checked with a DNA1000 chip (Agilent Technologies, Paris, France).

Illumina MiSeq library preparation and sequencing

In order to pool and sequence a large number of libraries simultaneously, samples were coded with individual barcode sequences during library preparation: 6-bp unique indices and the second part of the forward (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT-3') and reverse adapters (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-NNNNNN-GTGACT-3') were added during the Illumina PCR. PCR comprised an initial denaturation step at 94°C for 10 min, followed by 12 amplification cycles of 94°C for 1 min, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and a final elongation step at 72°C for 10 min. Amplicons were then purified on Clean PCR magnetic beds (Clean NA, Alphen aan den Rijn, The Nederlands). Their concentration after purification was estimated with a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientif, Whaltham, USA) and their quality was checked using a Fragment Analyzer (AATI, Santa Clara, USA). Reads from libraries were pooled in equal amounts, in

order to obtain a final concentration for sequencing between 5 and 20 nM. Pools were denatured with NaOH, mixed with the PhiX control library v3 (diluted to 7 pM; Illumina, San Diego, USA), and loaded on an Illumina MiSeq cartridge. The MiSeq Reagent Kit v3 (2x300 paired-end reads, 15 Gb output) was used according to the manufacturer's instructions. The quality of the obtained sequences was checked with FastQ files generated at the end of the run (MiSeq Reporter Software, Illumina, USA) and additional PhiX Control. The corresponding pairs of sequences were then attributed to their respective samples using the individual multiplexing barcodes.

Quality control of raw MiSeq reads and OTU clustering parameters

Samples were sequenced in three runs (295 amplicons of *gyrB* analyzed in runs 1 and 2 and 28 amplicons of 16S rRNA gene analyzed in run 3). Quality controls indicated a quality score of at least 30 for 91% of the reads and a median number of 44,022 ± 33,312 reads per sample.

We used FastQC (https://github.com/s-andrews/FastQC) to assess sequencing quality. Paired-end sequences were then merged using PEAR v0.9.10 (Zhang *et al.*, 2014) with a minimum overlap of 20 nucleotides for both *gyrB* and 16S rRNA gene and a threshold p-value of 0.01. We retained merged sequences with a size of 280 ± 50 bp for *gyrB* and 450 ± 50 bp for 16S rRNA gene. Primer-binding sequences were removed using CUTADAPT v1.12 (Martin, 2011) with a maximum error rate of 0.01; low-quality bases at the ends of the merged sequences (quality threshold of 20, sequences with ambiguous bases N) were eliminated using SICKLE v1.330 (https://github.com/najoshi/sickle).

Quality-filtered merged sequences were then loaded in the FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solutions) pipeline (Escudié et al., 2018) and dereplicated. SWARM clustering (Mahé et al., 2014) was performed using a maximal aggregation distance of three nucleotides for 16S rRNA gene sequences; for *gyrB* sequences, clustering was more stringent, with a maximal aggregation distance of two nucleotides in order to potentially assign OTUs to the subspecies level. Chimeras were removed using the VCHIM feature of the VSEARCH package (https://github.com/torognes/vsearch). Clusters were further filtered to remove spurious low-abundance OTUs arising from sequencing artifacts. As

reported by Bokulich and colleagues (2013), these types of OTUs appear in very few samples with very low abundance (<0.005%). Therefore, for the *gyrB* reads we retained OTUs with at least 100 reads in the whole dataset (0.002% of 5.9 million reads in total), and for the 16S rRNA gene used as controls, we retained OTUs with at least 10 reads in the whole dataset, since there were fewer samples than for *gyrB* (0.0008% of 1.3 million reads in total).

These steps resulted in the retention of 238 *gyrB* OTUs and 88 16S rRNA gene OTUs. An otu_table with the respective normalized abundances of the different OTUs in each sample was constructed for both the *gyrB* and 16S rRNA gene datasets. The total number of reads per sample was normalized based on the median sequencing depth of all samples.

Taxonomic assignment and phylogenetic tree construction

For certain species of Firmicutes, PCR amplification of *gyrB* can also recover the *parE* gene, which encodes the β subunit of DNA topoisomerase IV. In order to determine which of the two genes had been amplified for each species, the OTU sequences were blasted against the *gyrB*/*parE* databases established by Poirier (2018a), using the Blastn+ algorithm (Camacho *et al.*, 2009) for taxonomic assignment. Both *gyrB* and *parE* OTUs were retained in our diversity analysis. We considered taxonomic assignments to be valid when 94% of a sequence matched over 200 bp of coverage; valid matches were assigned identifications at least at the species level and in some cases at the subspecies level.

Sequences of 16S rRNA gene were identified using the Ribosomal Database Project (RDP) Classifier (Wang *et al.*, 2007) and the SILVA 128 SSU databases (Quast *et al.*, 2013). Taxonomic assignment of the different OTUs to genera and, when possible, to the species level was carried out based on a threshold of 97% identity. The Ez-taxon-e database was used to identify uncultured species (Kim *et al.*, 2012) that had not been previously identified with SILVA.

For each dataset, phylogenetic trees were created with SeaView software (Gouy et al., 2010) using the Kimura-2-parameter algorithm (Kimura, 1980) as distance estimator. Distance matrices were converted to trees using the BioNJ neighbor-joining method (Gascuel, 1997).

Alpha/beta diversity and statistical analyses

Bacterial diversity analyses were performed using the phyloseq package (v1.24.2) of R (McMurdie and Holmes, 2013). The relative abundance of bacterial species in samples was plotted with the function plot_composition. A dendrogram based on Bray-Curtis dissimilarity index values was plotted with the function as.dendogram, using the ward.D2 method, and visualized with the function fviz_dend in the gglot2 package (v3.0.0) of R. To visualize the results of principal coordinate analyses (PCoA), samples were first ordered according to Bray-Curtis dissimilarity index values using a non-metric dimensional scaling (NMDS) approach, and then plotted with the function s.class within the ade4 package (v1.7-13) of R (Chessel *et al.*, 1987). Bacterial diversity was compared among different groups of samples with permutational ANOVA, specifically using the adonis function within the vegan package (v2.5-2; https://github.com/vegandevs/vegan) of R. Boxplots were drawn with the ggboxplot function from R's ggpubr package, v0.1.8. In Figure 19, the significance of differences between groups of samples was assessed with ANOVA, followed by a Student's t-test. In Figure S4, the significance of the differences between groups of samples was estimated with a Mann & Whitney non-parametric test, since the number of samples was less than 30 for each group. For correlation plots, the correlation coefficient was calculated with the cor function using the Pearson method and visualized using the corrplot function within the corrplot package, v0.84 (https://github.com/taiyun/corrplot). A heatmap was drawn with the plot_heatmap function of the ggplot2 package, v3.0.0 (Wickham, 2010).

Data availability. Raw paired sequences have been deposited in the Sequence Read Archive database under the accession numbers SAMN11405181 to SAMN11405379 and SAMN11936727 to SAMN11936732, corresponding to BioProject PRJNA532535.

RESULTS

Sampling strategy

Through a survey of a single production unit, we identified five processing steps as potential sources of bacterial contamination, with each step potentially able to induce variations in bacterial species diversity and population level. These steps were the transportation of raw meat from the slaughterhouse to the ham-producing factory, churning, drain-off after cooking, slicing, and packing. Although this is an industrial process, over the course of a year, these steps are often subject to important variations in duration or in exposure to aerobiosis/anaerobiosis conditions. To assess the role of each step in shaping bacterial diversity, we set up a complete factorial design in which each of the five processing steps was sampled at two different levels, chosen specifically from those encountered in the focal production unit (Table 5). With this sampling design, a total of 32 hams were sampled, each produced under slightly different conditions (Figure 15). Although all meat was purchased from the same slaughterhouse, we also assessed possible variations due to changes in the initial meat microbiota over an extended period; specifically, we conducted four separate sampling campaigns over a period of six months: in June (Campaign C1), August (Campaign C2), September (Campaign C3), and November (Campaign C4). Overall, 128 different hams (32 x 4) were sampled.

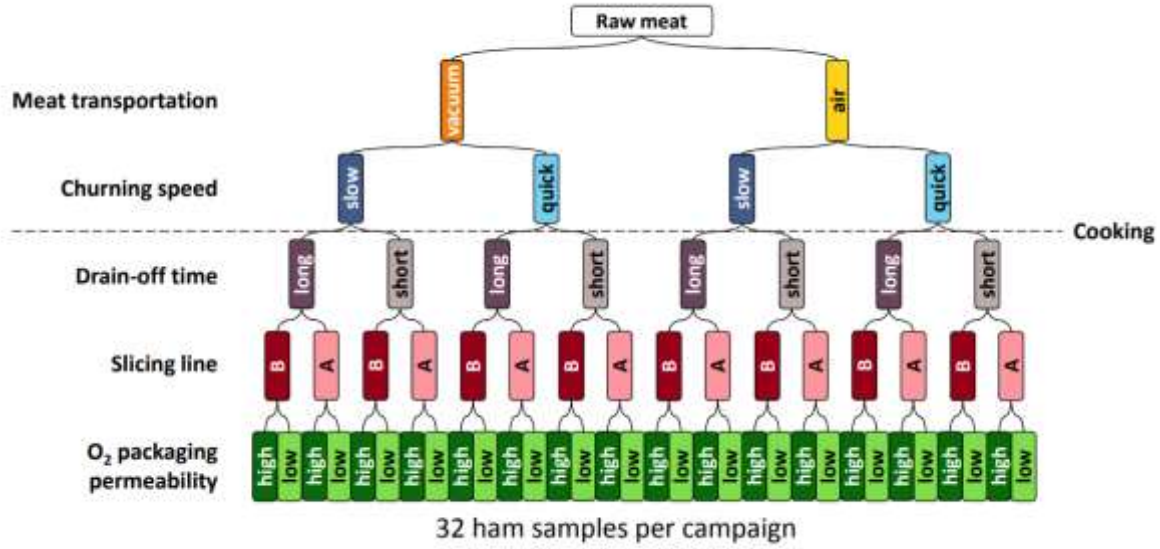


Figure 15: Ham sampling strategy.

Sampling strategy based on a complete factorial design, with two levels for each of the five processing steps: meat transportation, churning, drain-off, slicing, and O_2 packaging permeability.

The variations in ham production that were evaluated by our factorial design were necessarily accompanied by variations in the total length of processing, from a minimum of 12 days to a maximum of 28 days. However, optimal operational procedures for slicing and packing required that these two steps be carried out with the shortest possible delay. Due to these constraints, each sampling campaign required the use of four different batches of raw meat for ham production, as shown in Figure S1. Although our study was primarily focused on the final bacterial diversity of ham (after cooking, slicing, and packing), we incorporated some controls by measuring the bacterial diversity before cooking (after churning) in two campaigns (C2 and C3). Finally, each cooked ham was analyzed at two storage times: at the use-by date (UBD) and after 15 days of extended storage (past UBD), corresponding respectively to samples stored at 8°C for 28 and 43 days (see Fig. S1). Altogether, the sampling comprised a total of 256 hams.

Bacterial diversity in cooked ham was low and was shaped by both pre- and post-cooking processing steps

Bacterial diversity was assessed with MiSeq paired-end *gyrB* amplicon sequencing, which enabled accurate taxonomic assignment of OTUs to the species level (Poirier *et al.*, 2018b). Amplification of 16S rRNA gene was performed for fourteen samples as a control and confirmed that there was no bias in species detection and relative abundance resulting from the use of *gyrB* (see supplementary Fig. S2). For *gyrB* amplicon sequencing, the success rate for DNA extraction and sequencing was around 80%, which yielded a dataset of 200 samples out of the 256 initially planned. However, the failed samples were scattered throughout the factorial design and campaigns and thus did not reduce the effectiveness of our statistical analysis. From the whole *gyrB* dataset, 157 OTUs were identified and assigned to 44 different bacterial species (average of four OTUs per species). As shown in Table 6, the mean number of species identified per sample was approximately 15 species.

Table 6 : Comparative table showing the number of species (after merging OTUs with similar taxonomic assignments) identified in different subsets of samples.

	Sample subsets		
	Churned meat (15 samples)	**Ham at UBD (92 samples)**	**Hams past UBD (108 samples)**
Campaign 1 *	-	16 ± 3	13 ± 4
Campaign 2 *	50 ± 8	13 ± 4	14 ± 5
Campaign 3 *	41 ± 10	13 ± 6	14 ± 7
Campaign 4 *	-	14 ± 7	25 ± 6
Total number of species	55	43	44
	70		

* Mean number of species

The majority of the bacterial diversity in cooked ham samples was represented by approximately fourteen different species in various combinations, which together corresponded to a mean of 98% of the total relative bacterial abundance (Figure 16). To correlate differences in bacterial community composition to variations in processing steps, we performed a comparative compositional analysis using the Bray-Curtis dissimilarity index and non-metric multi-dimensional scaling (NMDS). This analysis revealed that ham bacterial communities at the UBD were not significantly different from

those past the UBD, and further revealed that slicing line and sampling campaign were the main factors that shaped these communities (Figure 17). In order to better understand these differences, bacterial assemblages were plotted according to these two processing parameters. Figure 18 illustrates how these parameters influenced both the relative abundance and presence/absence of core bacterial species. Briefly, the identity of the slicing line influenced the overall distribution of multiple bacterial genera (e.g., *Carnobacterium* in line A *versus Leuconostoc* and *Serratia* in line B). Within each genus, the slicing line also influenced the identity of the species present (e.g., *C. divergens* in line A *versus C. maltaromaticum* in line B). Certain species also appeared in multiple sampling campaigns of a given line (e.g., *L. mesenteroides* present in campaign C1 and C2 for line A; *L. gelidum* subsp. *gelidum* present in campaign C3 for line B; *L. sakei* present in campaign C1 for line B; *C. maltaromaticum* present in campaign C2 and C3 for line B).

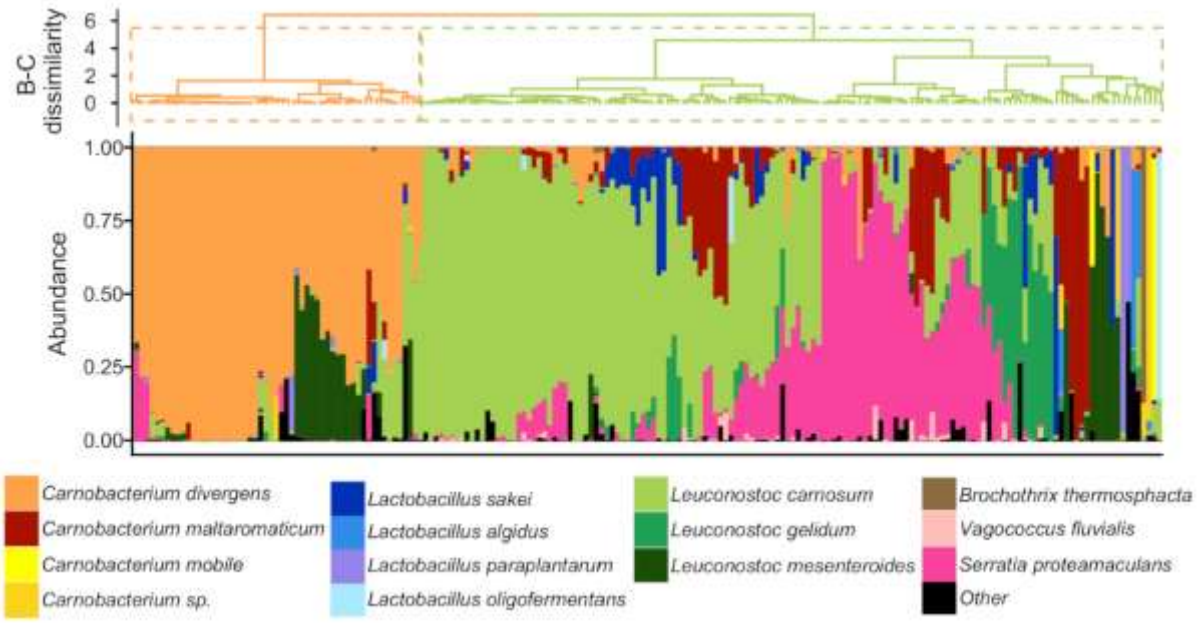


Figure 16: Ward unsupervised clustering of the microbiota of cooked ham samples according to Bray-Curtis dissimilarity index.

The clustering analysis revealed two main clusters, which were further subdivided into several clusters of various sample sizes. Below the clustering tree is a species composition plot (relative abundance) for the fourteen most-abundant species.

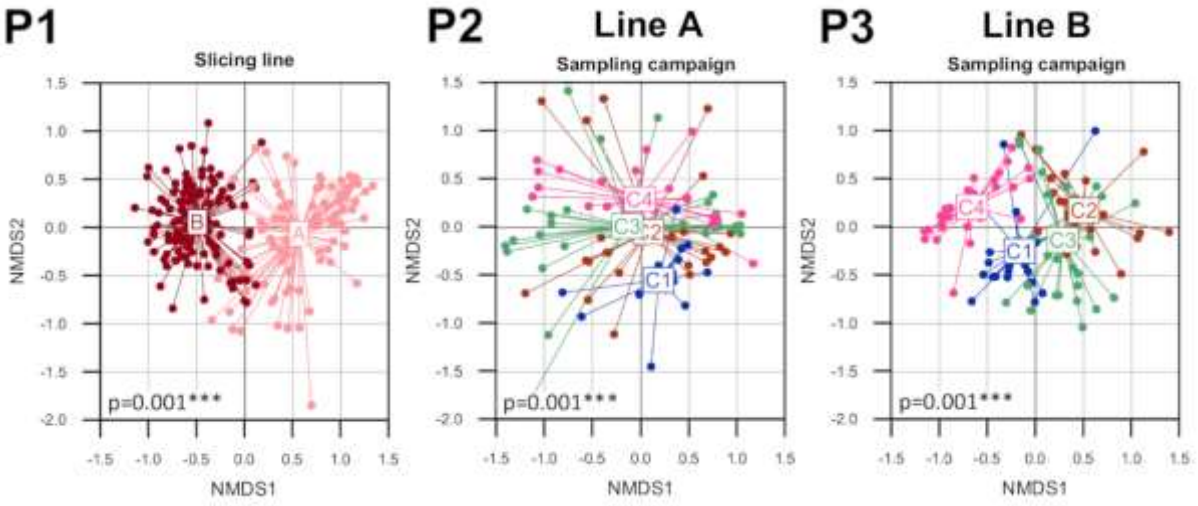


Figure 17: Non-metric multi-dimensional scaling analysis of cooked ham microbiotas based on Bray-Curtis dissimilarity index.

Panel P1: The bacterial assemblage of each cooked ham sample is represented by a dot, colored according to the slicing line on which the ham was processed (red = slicing line B; pink = slicing line A). Panels P2 and P3: cooked ham assemblages were subdivided based on slicing line (most discriminant parameter), and each subset (line A in panel P2; line B in panel P3) was analyzed separately, with the samples colored according to their sampling campaign of origin (blue = campaign C1; red = campaign C2; green = campaign C3; pink = campaign C4). The other processing steps had no influence in structuring overall bacterial diversity (see supplementary Fig. S3). For slicing line and sampling campaign, differences in composition between the bacterial communities present in the tested conditions were estimated using permutational ANOVA. Corresponding p-values are indicated under each plot.

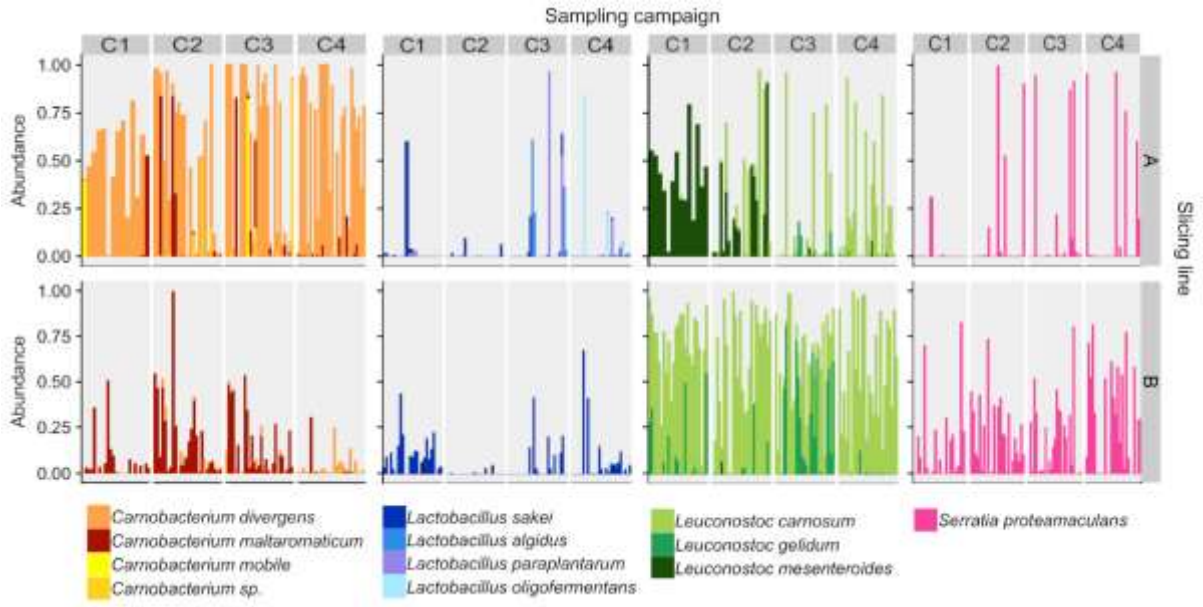


Figure 18: Species composition plots of cooked ham microbiota separated by slicing line and sampling campaign.

Bar plots show the relative abundance of the fourteen core bacterial species in cooked ham. Cooked ham samples are distributed vertically by slicing line of origin (top = samples from line A; bottom = samples from line B). Within each slicing line, ham samples are distributed horizontally according to the four main bacterial genera present (from left to right: Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, and Serratia) and then according to sampling campaign (C1 to C4).

It should be noted that the effect of churning time on the cooked ham microbiota was also revealed to be statistically significant, although it was less obvious from the NMDS analysis (see supplementary Fig. S3). Indeed, this effect was mostly significant in cooked ham from slicing line A. Similarly, O_2 packaging permeability had a significant effect on the microbiota of line B only. We linked this observation to the fact that *S. proteamaculans,* the only dominant Proteobacteria found among cooked ham samples, was much more prevalent in samples from slicing line B (in 58% of samples from line B *versus* 17% of samples from line A). Moreover, samples of line B differed greatly in the relative abundance of this species, which suggests the influence of another processing step than the slicing line. Indeed, when samples from line B were analyzed separately, we observed that *S. proteamaculans* was significantly more abundant in samples produced with processing steps that had higher oxygen levels (air transportation and high O_2 packaging permeability; see Figure 19 Panel P1). We also noted that, at the UBD, O_2 was not detected in cooked ham samples packed in highly

permeable packaging (data not shown). Therefore, any O_2 that permeated the packaging seemed to have been rapidly consumed by the microbiota. In slicing line A, instead, the relative abundance of *C. divergens* appeared to be correlated with churning, as the abundance of this species increased in ham that was churned quickly (see Figure 19 Panel P2).

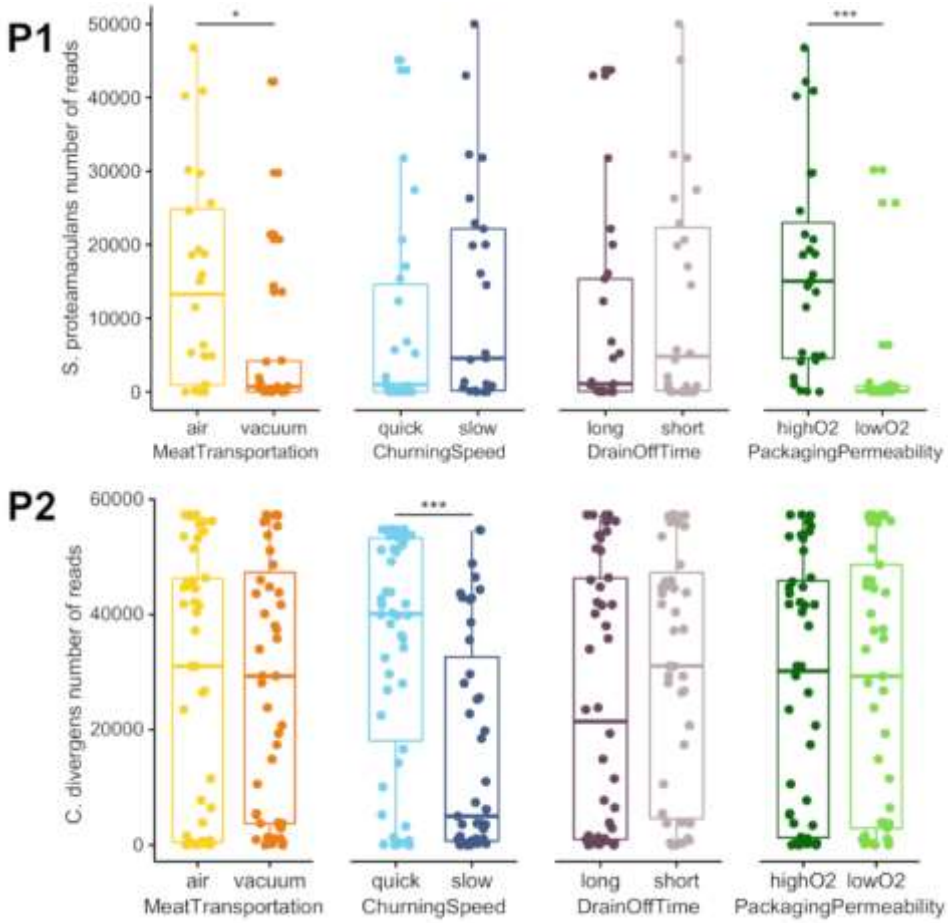


Figure 19: Comparative analysis of the relative abundance of S. proteamaculans and C. divergens in cooked ham samples as a function of processing parameters.

*Panel P1: relative abundance (in number of reads) of S. proteamaculans in samples from slicing line B as a function of the other processing parameters. Panel P2: relative abundance (in number of reads) of C. divergens in samples from slicing line A as a function of the other processing parameters. Statistical variance between groups of samples was determined with ANOVA followed by a Student's t-test. The number of stars indicates the p-value: *** p-value < 0.001; ** p-value < 0.01; * p-value < 0.05.*

To summarize, our data indicated that the four main processing parameters that shaped the types of bacterial communities present in cooked ham were, in decreasing order of influence, identity of

slicing line, sampling campaign (different meat batches over six months of sampling), O_2 permeability of packaging, and churning speed. Two of these processing steps occurred post-cooking (slicing line and packaging type) and two occurred pre-cooking (campaign and churning speed).

Bacterial species present in cooked ham mostly originated from raw meat and were among the most abundant species in meat samples after churning

Because the slicing line had a strong influence on the type of microbiota present in ham samples, even in samples that originated from the same batch of raw meat, we next investigated whether the bacterial species identified after cooking were also present before cooking. Furthermore, the slight influence of pre-cooking factors such as sampling campaign and churning speed on the relative abundances of certain species raised questions regarding the effectiveness of the cooking step in controlling bacterial populations. As shown in Figure 20, we found that the most abundant species in cooked hams were also present in raw meat after churning: *C. divergens, L. sakei*, *C. maltaromaticum*, *L. carnosum, L. gelidum*, *S. proteamaculans*, and *L. mesenteroides*, in decreasing order of abundance. Overall, cooking eliminated only 50% of the species present in raw churned meat, mostly those that were subdominant. Among species that were highly abundant in raw churned meat, the cooking step eliminated Proteobacteria (e.g., *Pseudomonas* species*)* more effectively than Firmicutes, with the exception of *S. proteamaculans.* However, we also found evidence for post-cooking contamination, as illustrated by the presence of species in cooked hams that had not been detected in raw churned meat for those sampling campaigns (e.g*., Vagoccocus fluvialis*).

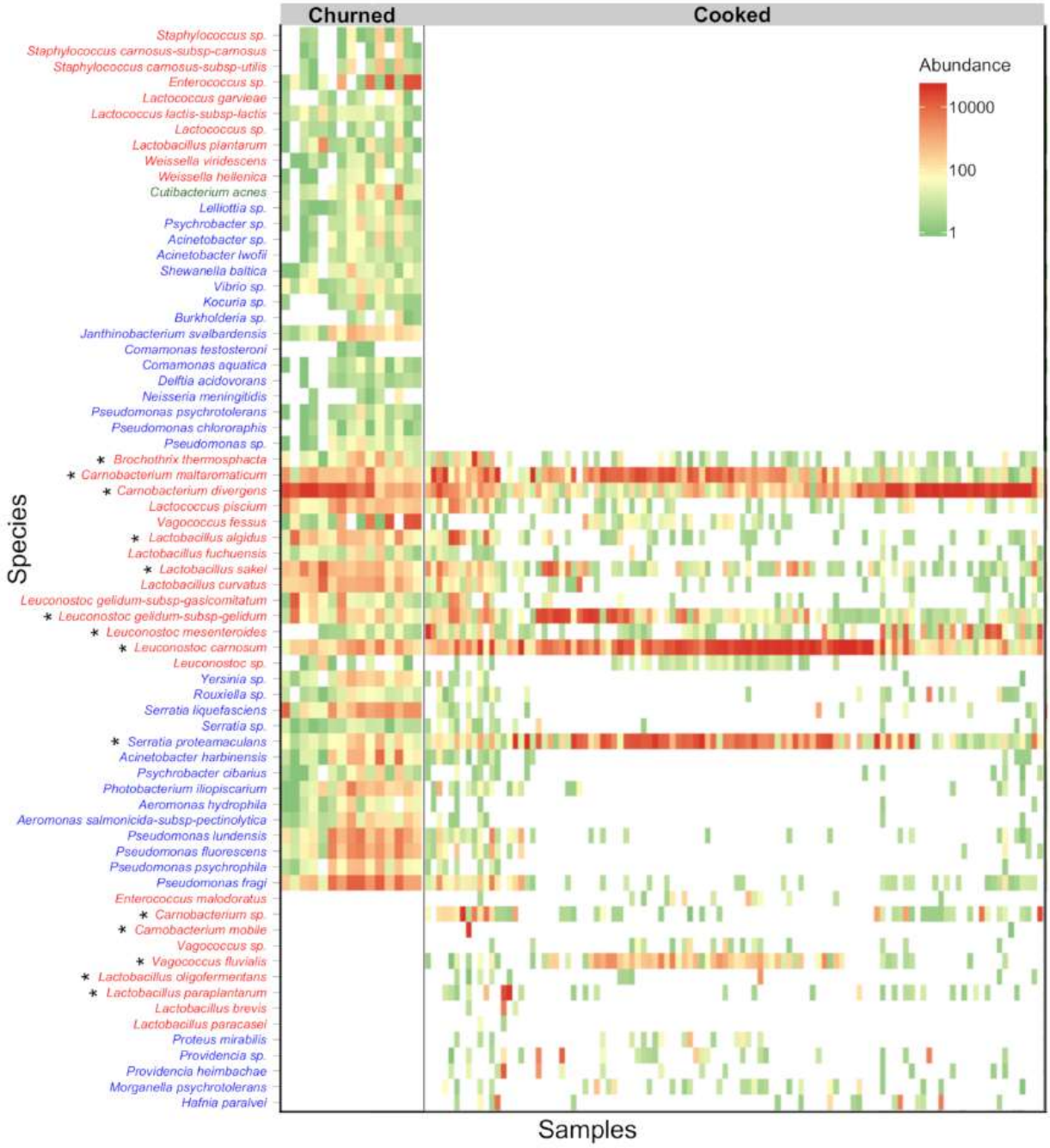


Figure 20: Heatmap depicting the effect of cooking on bacterial species abundances in ham.

Samples from campaigns C2 and C3 are ordered according to the sample type: left, raw meat after churning, and right, cooked ham at UBD. Bacterial species are ordered in three groups from top to bottom: species present only before cooking (hence eliminated by the cooking step), species present before and after cooking (either resistant to cooking or reintroduced after cooking), and species present only after cooking (contamination). Within each group, species are ordered by their taxonomic relationships. Species names colored in red, blue, or green indicate placement within the phyla Firmicutes, Proteobacteria, or Actinobacteria, respectively. Stars indicate the fourteen most-abundant species in cooked ham. The scale in the top-right corner of the heatmap depicts the color palette associated with the relative numbers of reads of the various species. The black vertical line represents the cooking step.

The production of fermentation-derived metabolites, used as spoilage indicators, was species-dependent and driven by population abundance

Next, we focused our analysis on the consequences of these different community patterns for the quality of the cooked ham. Of the important characteristics of spoilage, we chose to assess bacterial load, decrease in pH (an indicator currently used in the meat industry to detect spoilage), and the production of volatile organic compounds (VOCs). Additionally, since ham contains glucose, we also measured the concentration of end-products from the mixed-acid fermentation of pyruvate (both L- and D-lactic acid, acetic acid, formic acid, and ethanol). Because no differences were detected in the bacterial communities at the two sampling times (UBD or past UBD), we narrowed our analysis to UBD samples only (*n*=128) in order to determine whether any significant differences in spoilage characteristics were detectable in hams at the end of storage, prior to consumption.

At the UBD, the bacterial load of cooked hams from slicing line A (7.1 ± 1.0 $\log_{10}$ cfu.g^{-1}) was not significantly different from that of hams from slicing line B (7.7 ± 0.6 $\log_{10}$ cfu.g^{-1}). However, there were notable differences among ham samples, with a range of 4 to 9 log. Furthermore, we were intrigued that at a similar bacterial load, the mean decrease in pH from immediately after packaging (6.15 ± 0.06) to the UBD (6.05 ± 0.15) was significantly larger in samples from slicing line B (Fig. S4) and only when the bacterial load reached 7 $\log_{10}$ cfu.g^{-1}. This prompted us to analyze the possible correlation between decrease in pH, production of volatile organic compounds, pyruvate-derived end-products, and population abundances of the different bacterial species present in the microbiota of the two slicing lines.

From an initial screening of volatile organic compound production in hams, we noticed that the majority of VOCs were pyruvate-derived end-products, with ethanol representing around 90% of the total volatilome (see supplementary data Fig. S5), followed by butan-2,3-dione and butan-2-one in smaller proportions. Compounds derived from amino-acid metabolism, such 2-methylbutanal and 2-methyl-1-butanol, were also detected, but represented less than 5% of the total volatilome. Because of this, we focused our subsequent analyses on the main pyruvate-derived end-products.

As shown in Figure 21, an analysis of Pearson correlations revealed that decrease in pH was positively correlated to the production of D-lactic acid, acetic acid, and formic acid. The production of D-lactic acid was strongly correlated to that of ethanol and to the population abundance of *Leuconostoc* species (mainly *L. carnosum*). This observation is also illustrated in supplementary data Figure S6 showing the relationship between the production of end-products and the population abundance of each of the bacterial species that were targeted as potential producers. Instead, the production of acetic acid also showed a strong positive correlation with that of formic acid and to many of the species that are co-occurring on ham from slicing line B; namely *S. proteamaculans, C. maltaromaticum* and *V. fluvialis* (and to a lesser extent with *B. thermosphacta*). *C. maltaromaticum* in particular showed the strongest correlation to the production of formic acid. As presented earlier in Figure 18, *L. carnosum*, *C. maltaromaticum*, and *S. proteamaculans* were the most dominant species in samples from slicing line B, indicating that this type of microbiota may have a higher potential for spoilage than that of slicing line A. Conversely, the bacterial community of ham samples from slicing line A, in which these three species were subdominant with respect to *C. divergens,* correlated to lower production of these compounds. The production of L-lactic acid, on the other hand, was correlated to the abundance of *L. sakei* and *C. mobile*.

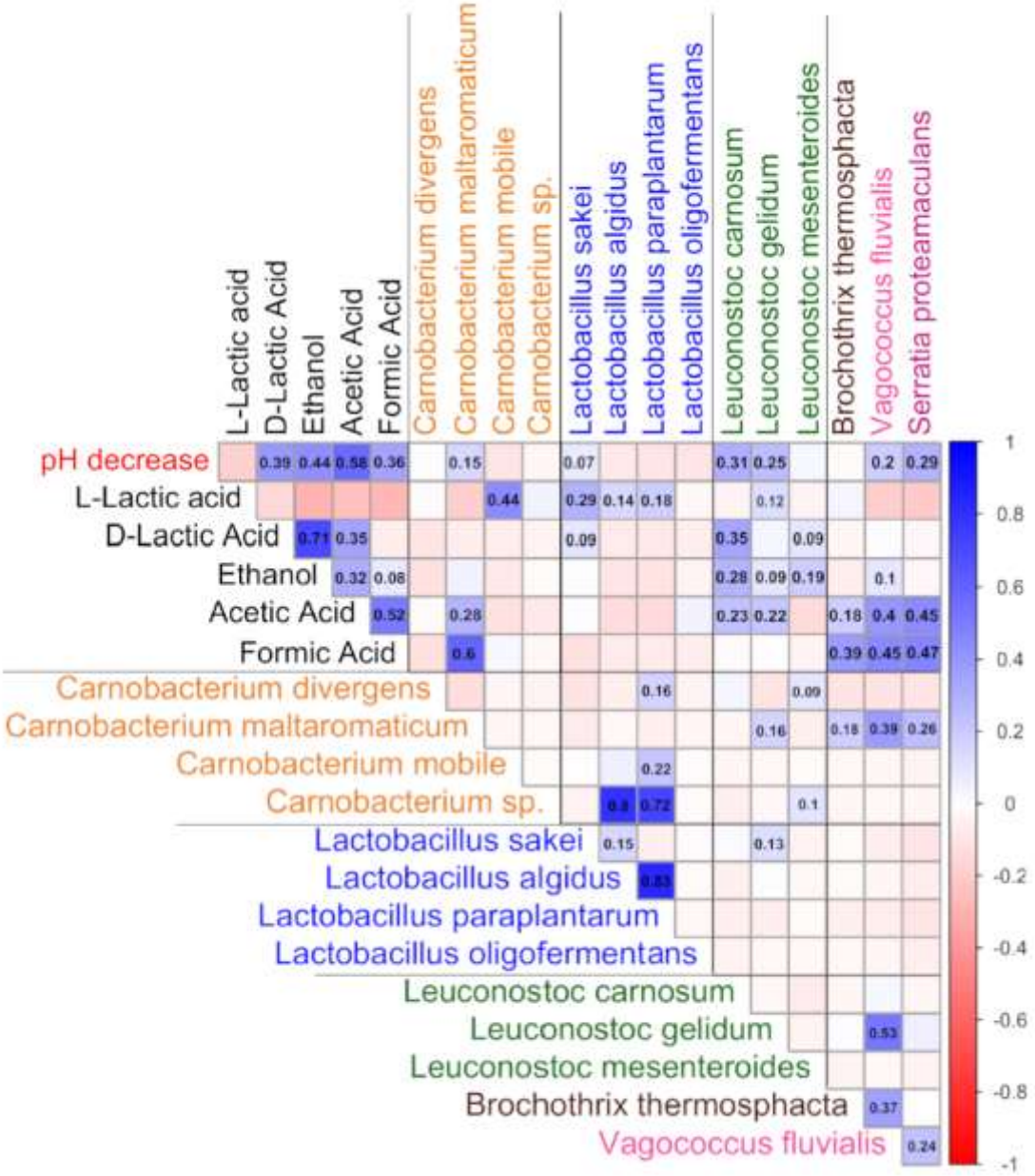


Figure 21: Correlation plot representing the Pearson coefficient between the production of end-products from the mixed-acid fermentation of pyruvate and the estimated load of bacterial species on cooked ham at the UBD.

Fermentation end-products are distributed according to the difference between the final concentration at the UBD and the initial concentration just after packaging. The absolute load of each bacterial species was estimated using the total bacterial load weighted by each species' relative abundance (percentage; see Materials & Methods). The Pearson correlation coefficient between the production of an end-product and the estimated load of a bacterial species is represented by a colored square. The scale on the right depicts the color palette associated with the value of the Pearson correlation coefficient (red, white, and blue corresponding respectively to a negative correlation, no correlation, and a positive correlation).

These results also prompted us to verify the effect of post-cooking factors (slicing line and O_2 packaging permeability) on the metabolic indicators (see Figure 22). With the exception of L-lactic acid, all compounds were present in higher concentrations in cooked ham from slicing line B. Furthermore, changes in the O_2 permeability of the packaging resulted in a switch from L-lactic acid production (low O_2) to acetic acid production (high O_2).

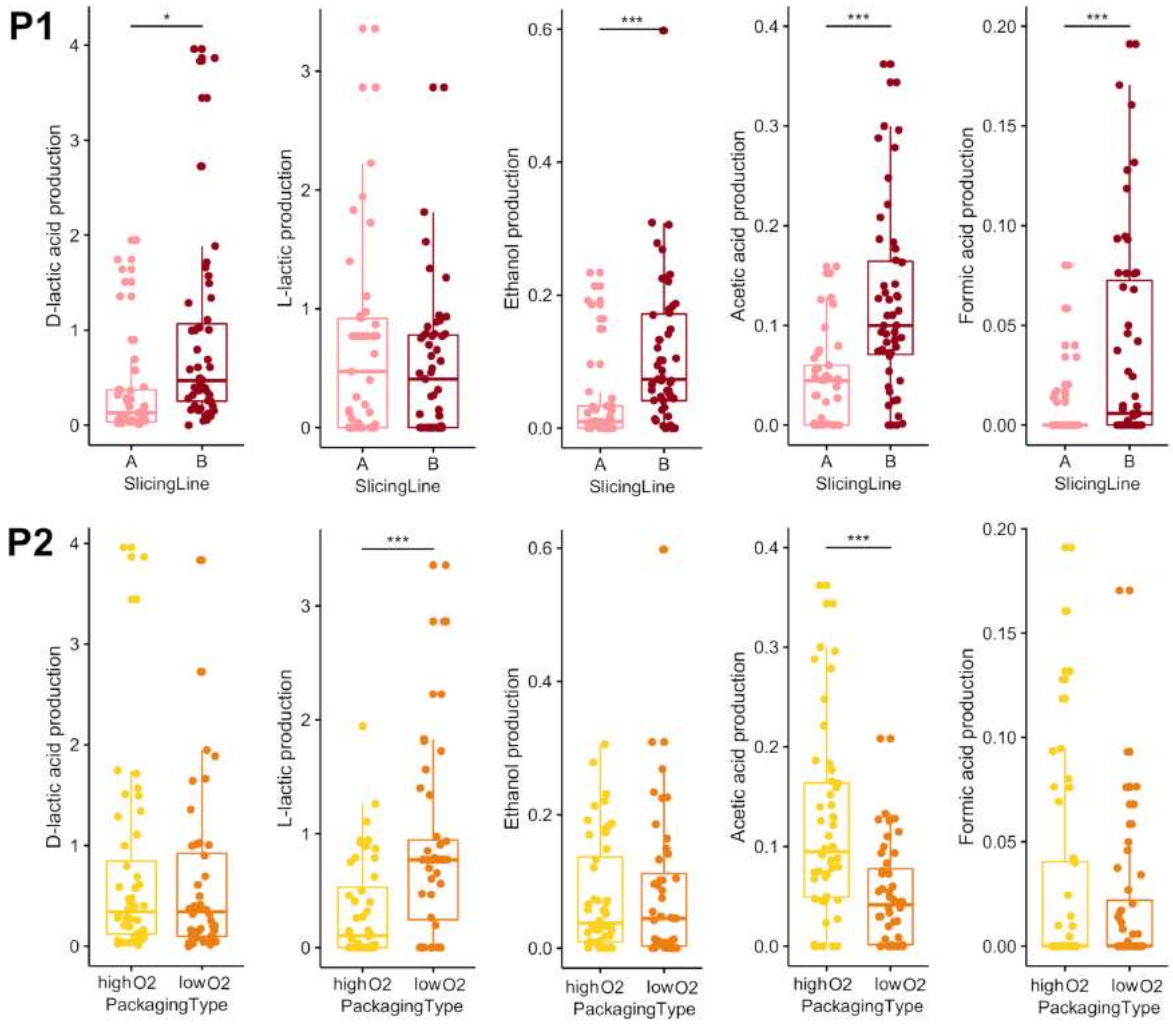


Figure 22: Box plots depicting the effect of the slicing line and O_2 packaging permeability on the production (in mg/g) of end-products at the UBD.

*Panel P1: samples are segregated by slicing line of origin. Panel P2: samples are segregated by O_2 packaging permeability. End-products are ordered from left to right by average production levels (decreasing). Statistical variance between groups of samples was determined with ANOVA followed by a Student's t-test. The number of stars indicates the p-value for the comparison: *** p-value < 0.001; ** p-value < 0.01; * p-value < 0.05.*

DISCUSSION

The aim of this study was to perform a large-scale analysis of bacterial diversity in order to survey and characterize the influence of the processing steps in the microbial ecology of cooked ham. Among the various parameters described in previous studies and known to play a role in the variability of this food product, we have chosen five of them upstream or downstream of the cooking step. To do this, we focused on a single facility and deployed an extensive sampling strategy, with a complete factorial design and we applied it several times over four months of production to strengthen our findings. Our study shows evidences for the role of major and minor factors on both sides of the cooking steps that are driving the microbial ecology of cooked ham and hence the ham quality.

After cooking, the slicing step creates most of the variability in ham bacterial communities and shapes the development of different spoilage metabolic profiles

Our first unambiguous demonstration is that, the slicing line was the main source of variability in the microbial assemblages of ham. Although similar implication of the slicing equipment in bacterial contamination has been previously made by other scientists (Pothakos *et al.*, 2015c; Vasilopoulos *et al.*, 2008), our analysis provides a better view of the impact that this process parameter is playing in ham quality. Indeed, in addition to prove that ham samples originating from the same batch of raw churned meat ended up with different bacterial communities based on the slicing line on which they had been cut after cooking, we demonstrate that each slicing line has a proper microbial fingerprint which remains rather stable in time. In the present case, the time spanned over several months from June to November during which the slicing lines were used several hundreds of times in the production unit between each sampling campaign. Furthermore, we show that the quality of cooked hams is also impacted by this specific processing step. It is important to remember here that the cooked ham samples that we analyzed at the UBD were generally not spoiled, and the production of spoilage metabolic indicators was usually very low. However, samples from line B showed higher production levels of fermentation-derived spoilage metabolites and a stronger pH decrease than

those from line A. Unsurprisingly, production of D-lactic acid and ethanol was positively correlated with the prevalence and population abundance of species from the genus *Leuconostoc* (especially *L. carnosum*) and thus was more elevated in samples from line B. Such finding corroborates previous studies which showed that members of the *Leuconostocaceae* family are generally identified as strong putative spoilers, since their presence in high amounts in meat samples is often associated with gas production, greening, ethanol production and/or acidification (Björkroth *et al.*, 1998; Comi and Iacumin, 2012; Samelis *et al.*, 1998; Raimondi *et al.*, 2019). This finding is also consistent with two aspects of *Leuconostoc* biology. Firstly, the well-known heterolactic fermentation of glucose by species belonging to the *Leuconostocaceae* family under anaerobiosis (Cogan and Jordan, 1994; Dols *et al.*, 1997) leading to lactate, acetate and ethanol as main end products. Secondly, the fact that *Leuconostoc* species preferentially produce D-lactate due to several D-lactate dehydrogenase-encoding genes in their genome.

Our results allowed us to draw similar conclusions on the impact of the slicing line on the production of acetic acid and formic acid (both with high correlation to pH decrease), increased in hams from line B when compared to hams from line A. The production of acetic acid by the ham microbiota is more challenging to interpret because, in addition to *Leuconostoc* species, several other species found on samples from line B can be involved in this process, most of which demonstrate co-occurrence relationships, such as *C. maltaromaticum*, *B. thermosphacta, S. proteamaculans*, and *V. fluvialis*. Nevertheless, our data are pointing out that the slicing line, as the main influencing factor on the microbiota structure, is modifying the production profile of these two acids. Thus, our results show that *C. maltaromaticum* and *S. proteamaculans* are the second confounding spoilers (after *Leuconostoc*) of cooked ham as they correlate with accumulation of acetic and formic acids. In particular, these two species distinguish themselves by specific production of formic acid in case of *C. maltaromaticum*, corroborating previous observations on *Carnobacterium* metabolism in meat (Borch and Molin, 1989b); and acetic acid by *S. proteamaculans*..

One of the reasons we suspect this *Serratia* species of being involved in acetic acid production is the influence played by the packaging with high O_2 permeability on both parameters, thereby indicating that this processing factor is also playing a role in the microbial ecology of cooked ham. This post-cooking condition favored both higher concentrations of acetic acid and the growth of *S. proteamaculans* in samples sliced on line B, while it did not affect microbial communities of hams sliced on line A (mostly deprived of *S. proteamaculans*). It is known that this facultative anaerobic species grows preferentially in the presence of O_2, as shown in a previous study of batch culture that compared growth with and without O_2 (Alfaro *et al.*, 2013). However, we were not able to detect oxygen in the packages of cooked ham at the UBD, indicating that when it permeates through the packaging, it is rapidly consumed by the microbiota and that *S. proteamaculans* alternates between quick aerobic respiration (when O_2 permeates the packaging) and longer period of glucose fermentation to acetate (when the O_2 is depleted).

Raw meat microbiota is another source of bacterial variability between samples and has a sampling campaign effect

Our data revealed that the composition of the cooked ham microbiota also depended on pre-cooking parameters, in particular on the sampling campaign (different meat batches), but this effect was somewhat dependent of the slicing line and only specific groups of species are involved in this variability (*e.g. L. mesenteroides* and *L. sakei* in June or *L. gelidum* in September). Seasonal variability of raw meat microbiota has already been evidenced (Lucquin *et al.*, 2012). However, our observation that a campaign-based effect can be evidenced on a cooked product raises the issue of the cooking step's effectiveness in eliminating initial meat microbiota. Indeed, such observation has already been done on cooked pork sausages (Hultman *et al.*, 2015). Here, we clearly show that the cooking step eliminated about half of the bacterial species present, mainly those with low abundance on raw churned meat, such as *Staphylococcus*, *Pseudomonas,* and *Yersinia*; whereas some species were clearly introduced during production (re-contamination after cooking), such as *V. fluvialis*. Most interestingly, we show that the dominant bacterial species identified on cooked ham at UBD could be

traced before and after cooking. We interpret this result as being the likely consequence of two phenomena: (1) there is a persistence of post-cooking living cells which could explain, for instance, why air raw meat transportation would influence the prevalence and abundance of *S. proteamaculans* or why churning speed would influence the relative abundance of *C. divergens* on cooked ham at UBD; (2) the slicing line is either a source of selection or a further source of contamination. Both assumptions cannot be refuted at this time, as the microbial ecology of the slicing lines was not included in this study. The two slicing lines studied in the factory are equipment from two different generations. Surprisingly, the newer line B of which the cutting mechanism is more complex than that of line A, produces ham with higher spoilage potential.

CONCLUSIONS

Our extensive survey of the microbiota of cooked ham from a single production unit provided us with a detailed view of the microbiota variability over a long production time and allowed us to characterize the ways in which the microbial ecology of this product is shaped by the various processing steps. Our results clearly demonstrate that the process (and especially the slicing step) has a more important microbial fingerprint than the raw meat on the final communities of cooked ham. This study illustrates the very important role this type of strategy could play in the food industry if applied more broadly to process management, such as for instance, defining more precise UBD according to the conditions of production.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the MIGALE bioinformatics platform at INRA (http://migale.jouy.inra.fr) for providing computational resources and data storage. We also thank the INRA @BRIDGe platform for carrying out the MiSeq sequencing runs. Marine ZAGDOUN was the recipient of ANRT grant number 2016/1038 (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Ile de France). The funders

had no role in the study's design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

SUPPLEMENTARY DATA

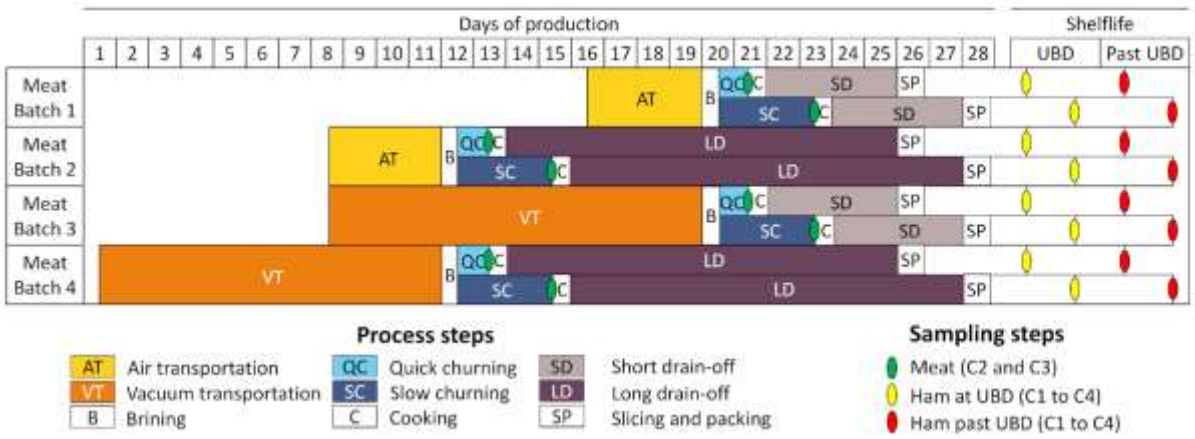


Figure S1: Management of sampling to optimize operational process requirements.

The ham production schedule for a single campaign is shown as a function of variations in the length of the different steps (depicted in days at the top of the figure). After slicing and packing, ham samples (represented by red and yellow ellipses) were collected for all campaigns (C1 to C4), whereas meat samples were collected before cooking (represented by green ellipses) for campaigns C2 and C3 only.

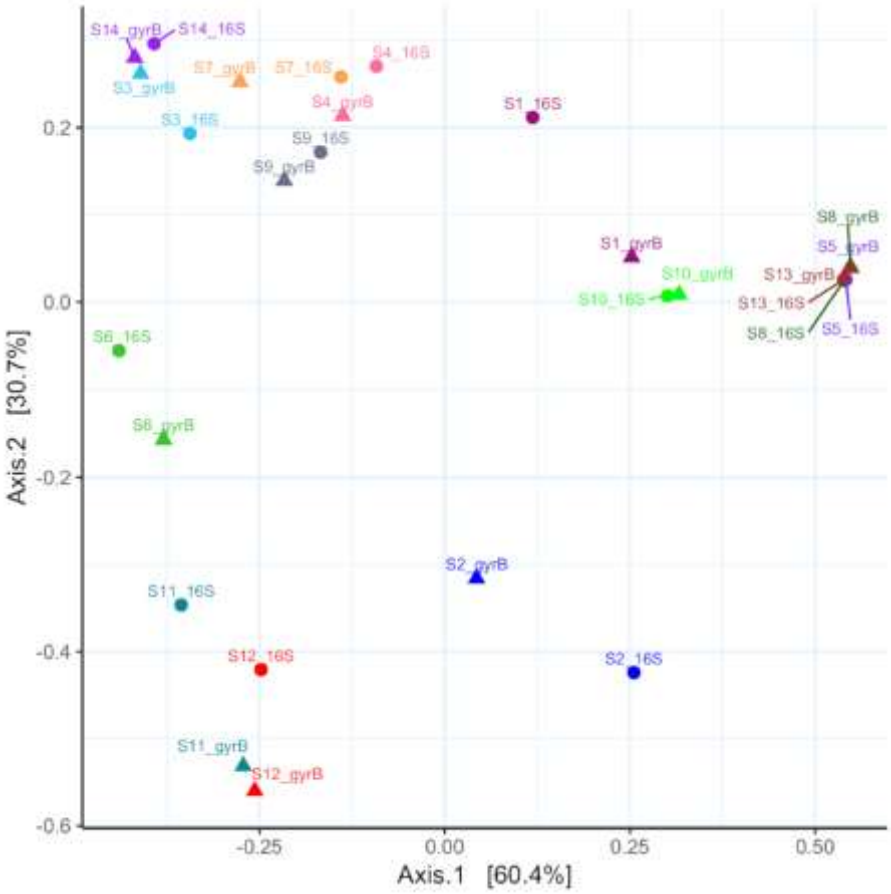


Figure S2: Principal Coordinates analysis based on Bray-Curtis dissimilarity index to compare ham microbial communities of samples using gyrB and 16S rDNA amplicon sequencing.

Samples S1 to S14 are labeled "gyrB" or "16S" according to the molecular marker used for bacterial identification. Samples from the four different sampling campaigns (C1 to C4) are represented: S1 from campaign C1; S2 to S4 from campaign C2; S5 to S10 from campaign C3; S11 to S14 from campaign C4. Samples S1, S4, S5, S8, S10 and S13 were sliced on line A and samples S2, S3, S6, S7, S9, S11, S12 and S14 on line B.

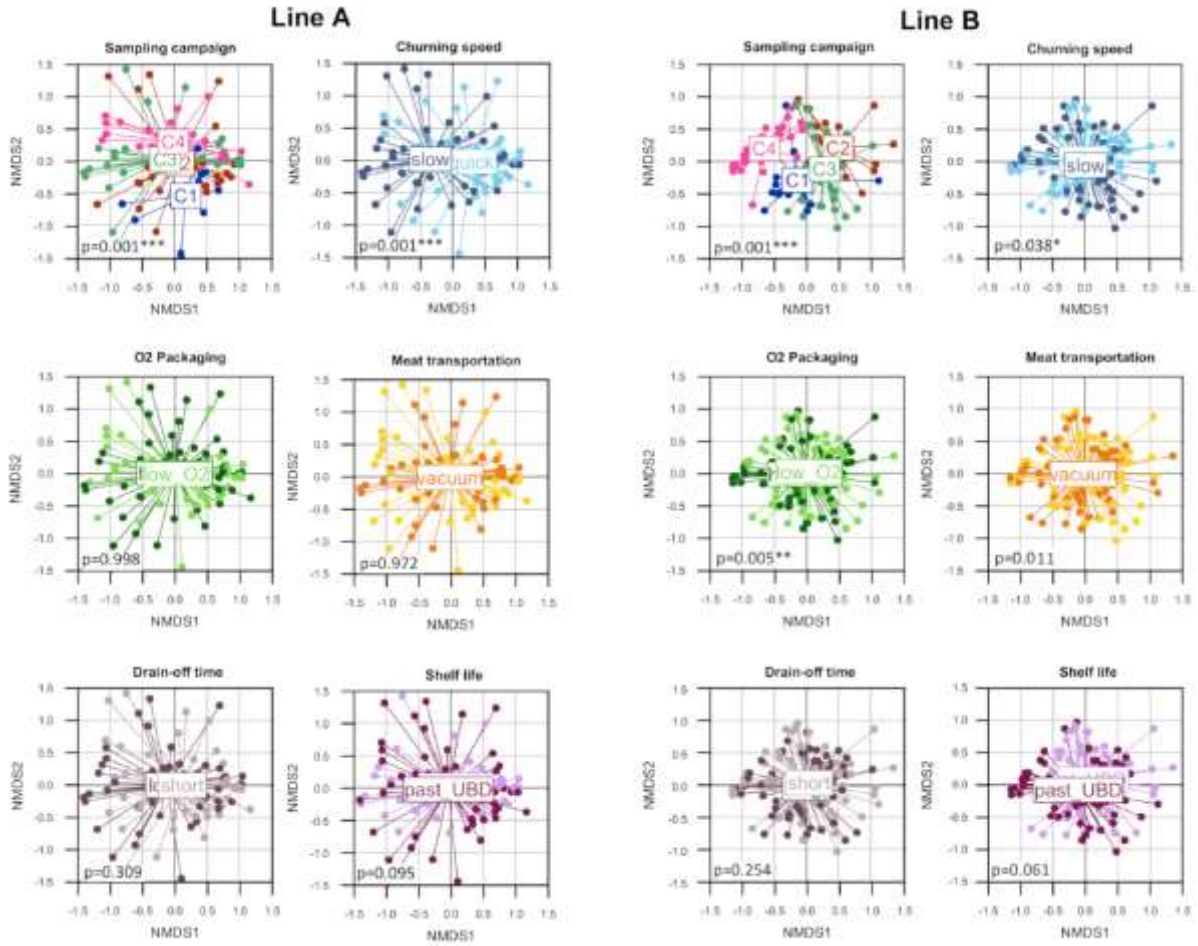


Figure S3: Non-metric multi-dimensional analysis of cooked ham samples based on Bray-Curtis dissimilarity index.

Samples were analyzed in two separated subsets, corresponding to samples from line A on the left side and samples from line B on the right side. Within a given subset of samples, ham samples were colored either according to: the sampling campaign (blue=C1; red=C2; green=C3; pink=C4); the churning speed (dark blue=slow; light blue=quick); the O_2 packaging permeability (dark green=high O_2; light green=low O_2); the conditions of transportation of raw meat (yellow=air; orange=vacuum); the drain-off time after cooking (dark grey=long; light grey=short); the shelf-life (light purple=UBD; dark purple=past UBD). For each graph, differences in composition between bacterial communities present in the two tested conditions were estimated using permutational ANOVA. Corresponding p-values are indicated under each plot.

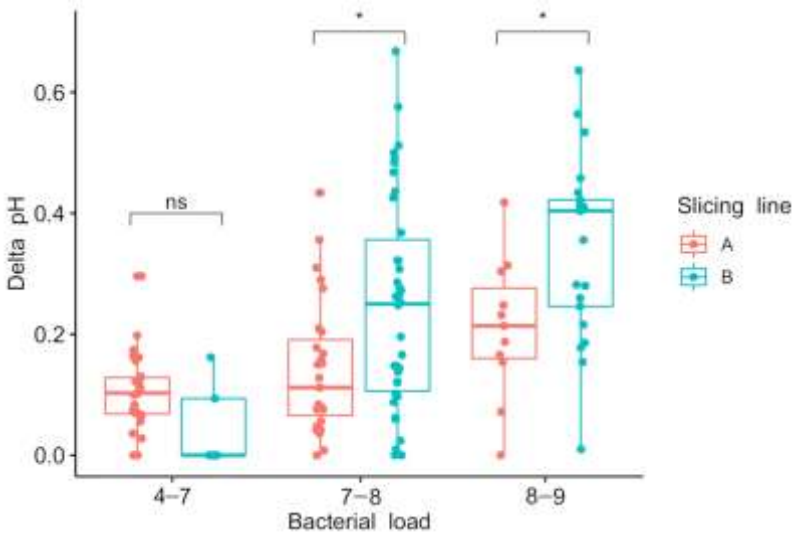


Figure S4: Boxplots depicting the decrease in pH of ham samples from slicing lines A and B as a function of total bacterial load.

*Bacterial load is represented in log_{10} cfu/g. Samples were segregated by their slicing line of origin and then sorted by their bacterial load, ranging from 4 to 9 Log_{10} cfu/g. Delta pH depicts the difference between the initial pH measured just after packaging and the pH at the UBD. Statistical variance between groups of samples within a slicing line was determined with a Mann & Whitney test. The number of stars indicates the p-value: * p-value < 0.05; "ns" for p-value > 0.05.*

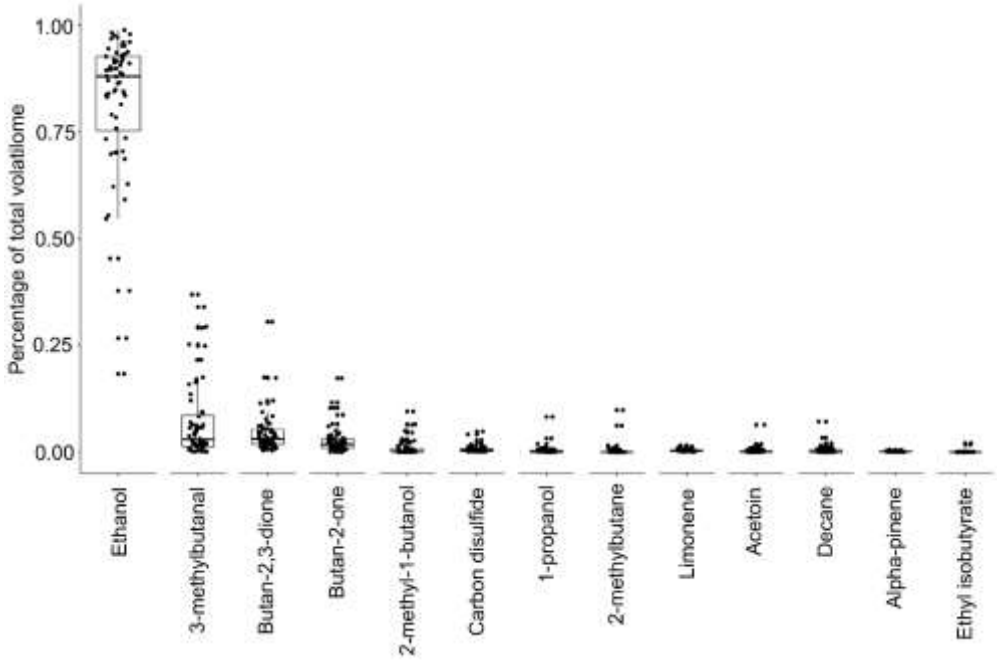


Figure S5: Boxplots showing the percentage of total emitted volatile compounds of hams at UBD.

Samples from campaigns C1 and C2 are represented. The compounds are ordered from left to right in decreasing order of abundance.

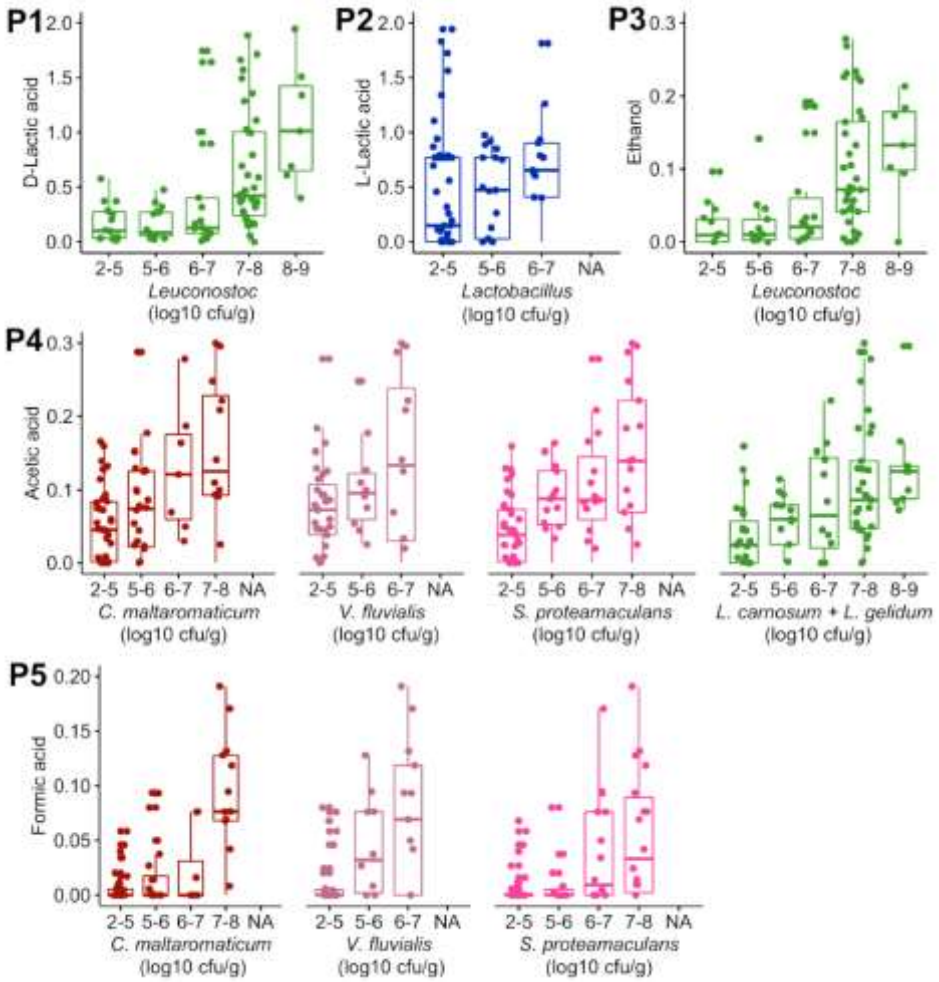


Figure S6: Boxplots showing the production level in mg/g of end products from mixed-acid fermentation of pyruvate according to the estimated load of bacterial species at UBD.

For each graph, all UBD samples were sorted according to their estimated load of a species of interest within bacterial communities (e.g. samples are sorted according to their estimated load of C. maltaromaticum). Samples where the estimated load of the species of interest was under 2 $\log_{10}$ cfu/g were not represented, in order to focus on samples where the species was representative. For some species, high loads were non-attributed and were labeled "NA". B. thermosphacta and C. mobile were not represented since they were present in too few samples to allow boxplot representation. Metabolites are ordered in Panels, from P1 (D-lactic acid) to P5 (formic acid) by average decreasing production levels.

2.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES

L'étude métagénétique présentée dans l'article décrit précédemment ne concernant que les communautés bactériennes, nous avons également recherché la présence de levures sur les jambons issus de deux campagnes d'échantillonnage (C2 et C3).

Les échantillons ont été analysés à DLC et après 15 jours de stockage abusif (DLC+50%) et les levures ont été recherchées sur un milieu de culture YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Agar*) en aérobiose à 20 °C. Des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture (80 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL d'ampicilline) pour inhiber tout développement bactérien. Les échantillons analysés à DLC ne présentaient pas de levures. En revanche, parmi les 24 échantillons analysés après 15 jours de stockage abusif, environ 25 % des échantillons présentaient des levures (majoritairement ceux de la campagne C3) à des niveaux de population relativement faibles, compris entre 1 et 4 $\log_{10}$ cfu/g. Nous avons noté que les échantillons présentant des levures provenaient à 80 % de la ligne de tranchage B et avaient à 75 % un emballage avec une forte perméabilité à l'O_2 (voir Table 7).

Table 7: Dénombrements de levures (log10 cfu/g) dans des échantillons prélevés après 15 jours de stockage abusif.

	Forte perméabilité de l'emballage à l'O_2		**Faible perméabilité de l'emballage à l'O_2**	
	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 2	Campagne 3
Ligne de tranchage A	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 3,4 0 3,7 0	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 4,3
Ligne de tranchage B	1,3 1,5 0 0 0 1 1 1,8	3,3 0 4,3 3,8 0 0 1,6 1,3	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 4,3 3,2 0 0 0 1,4

Afin de poursuivre l'identification de levures, nous avons séquencé le fragment ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) marqueur classiquement utilisé pour l'identification des levures. Nous avons ainsi identifié la présence de *Candida sake*, de *Candida argentea* et d'une espèce du genre *Torulaspora* (présentant 96 % d'identité avec *Torulaspora indica*). *Candida sake*, également appelée *Candida austromarina*, est connue pour croître en milieu salé (Nagahama, 2006) et *Candida argentea* a déjà été identifiée sur des jambons dans une étude récente (Raimondi *et al.*, 2019).

Ces espèces de levures étaient spécifiques d'une ligne donnée, *C. sake* étant uniquement présente sur les échantillons de la ligne A et *C. argentea* et *Torulaspora* sp. exclusivement présentes sur les échantillons de la ligne B.

Ainsi, nous avons montré que l'étape de tranchage sur deux lignes différentes affectait non seulement l'abondance relative des différentes espèces bactériennes dans les échantillons, mais aussi dans une moindre mesure celle des espèces de levures.

2.4 POINTS A RETENIR

Dans ce chapitre, nous avons montré que la diversité bactérienne à DLC et après 15 jours de stockage abusif (DLC+50%) des jambons était faible et représentée à 98 % par 14 espèces bactériennes. Comme la structure des communautés était la même à DLC et à DLC+50%, ces échantillons ont été analysés ensemble. Sur ces 14 espèces, neuf étaient présentes dans au moins 30 % des échantillons : *L. carnosum*, *L. gelidum*, *L. mesenteroides*, *C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *S. proteamaculans*, *L. sakei*, *V. fluvialis*, *B. thermosphacta*.

Nous avons identifié deux grands profils de communautés bactériennes et mis en évidence que la ligne de tranchage était le facteur principal à l'origine de cette variabilité. Sur les deux lignes de tranchage testées, les jambons issus de la ligne A étaient dominés par *C. divergens*, tandis que les jambons de la ligne B étaient dominés par *L. carnosum* et *S. proteamaculans* (prépondérante lorsque l'emballage le plus perméable à l'O_2 était utilisé).

Nous avons montré que chaque ligne de tranchage a une empreinte microbienne qui lui est propre et qui est relativement stable dans le temps.

Le critère ligne de tranchage s'est avéré un facteur de variabilité non seulement en matière de structure de communauté microbienne, mais également en matière de profils d'altération. Les jambons de la ligne A ne présentaient pas de métabolites d'altération particuliers, tandis que ceux de la ligne B présentaient une production d'acide acétique (corrélée à la présence de *L. carnosum* et *S. protemaculans*), d'acide D-lactique et d'éthanol (corrélés à la présence de *L. carnosum*), se traduisant par un pH plus faible.

Des variations de communautés bactériennes en fonction des différentes campagnes d'échantillonnage (correspondant à différents lots de matière première issus d'un même abattoir) ont également été détectées parmi les jambons issus d'une ligne de tranchage donnée. Ainsi, *L. sakei* (corrélé à une production d'acide L-lactique), *C. maltaromaticum* (corrélé à une production d'acides acétique et formique) et *L. mesenteroides* (corrélé à une production d'acide D-lactique et d'éthanol), prévalaient sur des jambons des campagnes d'été (C1 et C2).

Par ailleurs, nous avons montré que certains paramètres relatifs à des étapes pré-cuisson pouvaient modifier légèrement la structure des communautés des jambons cuits. Par exemple, la prévalence des espèces de *Carnobacterium* et de *S. proteamaculans* sur le produit fini était plus importante lors d'un barattage court et avec un transport de la viande crue à l'air libre respectivement.

Cette première étude a permis la caractérisation des communautés microbiennes du jambon et l'identification des différents paramètres du procédé de production les façonnant. Cette connaissance de l'écologie microbienne du jambon en conditions de production à des teneurs en sel et en nitrite standards constitue un point de référence pour étudier l'impact d'une réduction de sel et de nitrite.

3 IMPACT D'UNE REDUCTION DE SEL ET DE NITRITE SUR LE COMPORTEMENT D'UN ECOSYSTEME DE JAMBON SIMPLIFIE

3.1 CONTEXTE ET OBJECTIF

Pour étudier l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur le comportement des différentes communautés des jambons, nous avons procédé en deux études.

Dans une première étude, présentée dans ce chapitre, nous avons développé une stratégie expérimentale permettant d'acquérir rapidement des connaissances sur les comportements bactériens face à une réduction de sel et de nitrite. En effet, une réduction de sel et de nitrite est susceptible de modifier l'écologie microbienne du jambon cuit et il est nécessaire d'anticiper dans quelle mesure ces composés peuvent être réduits et quelles vont être les conséquences sur la conservation du produit. Or, nous avons vu que la variabilité des communautés bactériennes liée aux paramètres de production complique cette analyse.

Pour ce faire, nous avons choisi de développer une stratégie d'écologie synthétique. Cette approche à échelle réduite et en conditions contrôlées par rapport à l'échelle de production, consiste à élaborer une communauté synthétique mimant les communautés bactériennes naturellement présentes sur les jambons et à l'inoculer sur un milieu de culture stérile mimant le milieu jambon (voir Figure 23).

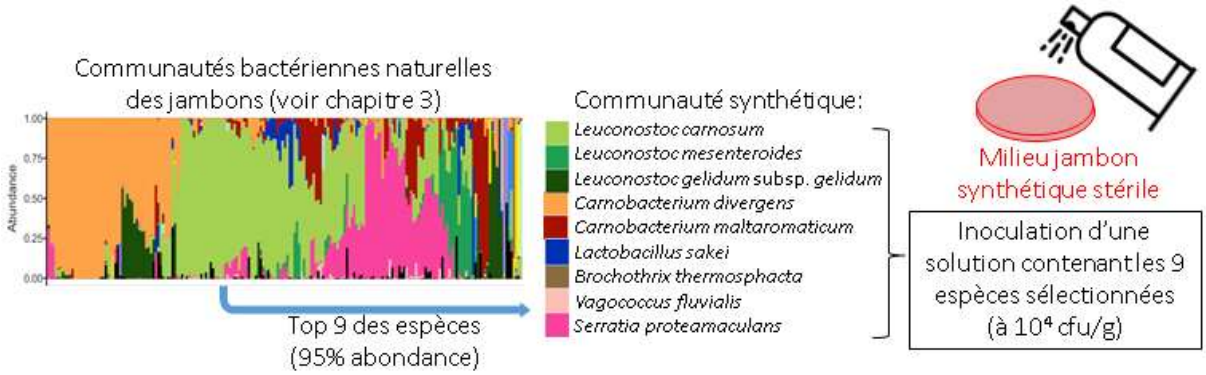


Figure 23 : Constitution d'une communauté bactérienne synthétique pour inoculation sur un milieu de porc gélosé stérile.

Nous avons fait le choix d'une communauté synthétique unique composée d'un consortium des neuf espèces bactériennes les plus abondantes dans les jambons, alors que deux grands profils de communautés bactériennes avaient été observés dans le chapitre 2, car ces espèces étaient généralement présentes dans les deux profils de communautés. Les souches utilisées ont été isolées des jambons de cette usine (voir 3.2 *Constitution d'une banque de souches isolées de jambons*).

Nous avons développé un milieu de culture proche de la composition nutritionnelle du jambon à base de jus de porc supplémenté avec du glucose, de l'ascorbate, du sel et du nitrite. Ce milieu nous a permis de nous affranchir de la variabilité microbiologique des jambons en sortie de production et d'ajuster facilement les concentrations en sel et en nitrite à tester.

Nous nous sommes ainsi assurés que tous les échantillons contenaient initialement les mêmes communautés et que les seuls paramètres variables influençant potentiellement la croissance des bactéries étaient le sel et le nitrite. Nous avons cherché à voir si une réduction de sel de 40 % par rapport aux teneurs utilisées dans le chapitre 2 (de 14 g/kg) et une suppression de nitrite induisaient un changement structural ou métabolique (lié à l'altération) des communautés du jambon. Les combinaisons de concentrations en sel et en nitrite dans la gamme testée ont été choisies selon un plan factoriel permettant la modélisation de surfaces de réponse (telles que la croissance des différentes espèces, le pH et la quantité de métabolites d'altération) en fonction des facteurs sel et nitrite. Ce plan permet l'observation de l'effet des facteurs sel et nitrite mais également des interactions potentielles de ces facteurs sur la croissance des bactéries et la production de métabolites d'altération.

La croissance des différentes espèces dans la communauté a été quantifiée par une approche ciblée de PCR quantitative, couplée à une quantification ciblée de métabolites par dosages enzymatiques, ceux-ci ayant été préalablement identifiés comme les métabolites d'altération principaux dans le chapitre précédent.

Les résultats de ce chapitre sont présentés en deux parties, une première partie portant sur la constitution d'une banque de souches isolées de jambons et une deuxième partie sous forme d'un article en cours de préparation.

3.2 CONSTITUTION D'UNE BANQUE DE SOUCHES ISOLEES DE JAMBONS

Dans l'optique de constituer une communauté synthétique, nous avons réalisé une banque de souches bactériennes isolées de jambons de l'usine de production étudiée (issus des différentes campagnes d'échantillonnage, produits sur différentes lignes de tranchage et avec des emballages ayant différentes perméabilités à l'O_2). Des isolats ont été collectés sur différents milieux de culture (MRS, BHI, Columbia agar avec 5 % de sang de mouton) contenant du bleu de Bromocrésol, afin de colorer différentiellement les colonies et d'aider à l'identification visuelle des différents morphotypes. Différentes conditions de croissance (aérobie/anaérobie) ont également été testées pour maximiser le spectre d'espèces et de souches isolées. Après 72 h d'incubation des souches pures à 20 °C dans leurs milieux de culture liquide respectifs, les bactéries ont été collectées pour extraction d'ADN.

Une première série d'identifications par PCR quantitative a ensuite été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques des espèces identifiées dans le chapitre 2 comme les plus fréquentes sur ces jambons. La séquence de ces amorces est renseignée dans la section *Materials and Methods* du chapitre 3. Cette première analyse a permis l'identification de 50 % des isolats. Les isolats restants ont été identifiés par séquençage du gène *SSU* rRNA complet (1,5 kb) et assignation taxonomique par alignement sur les bases de données de références. Tous les isolats ont pu être identifiés à l'échelle de l'espèce par alignement sur les génomes disponibles, à l'exception de deux souches de *Carnobacterium* et d'*Enterococcus*, alignées uniquement à l'échelle du genre, et constituant potentiellement de nouvelles espèces. Il peut être noté que le grand nombre de souches récoltées a permis d'isoler les deux sous-espèces de *L. gelidum* (subsp. *gelidum* et *gasicomitatum*) ainsi que des espèces identifiées comme sous-dominantes dans les jambons de cette usine (par exemple : *M. psychrotolerans* ou *P. fluorescens*). En somme, 157 isolats correspondant à 19 espèces différentes ont été identifiés (voir Figure 24).

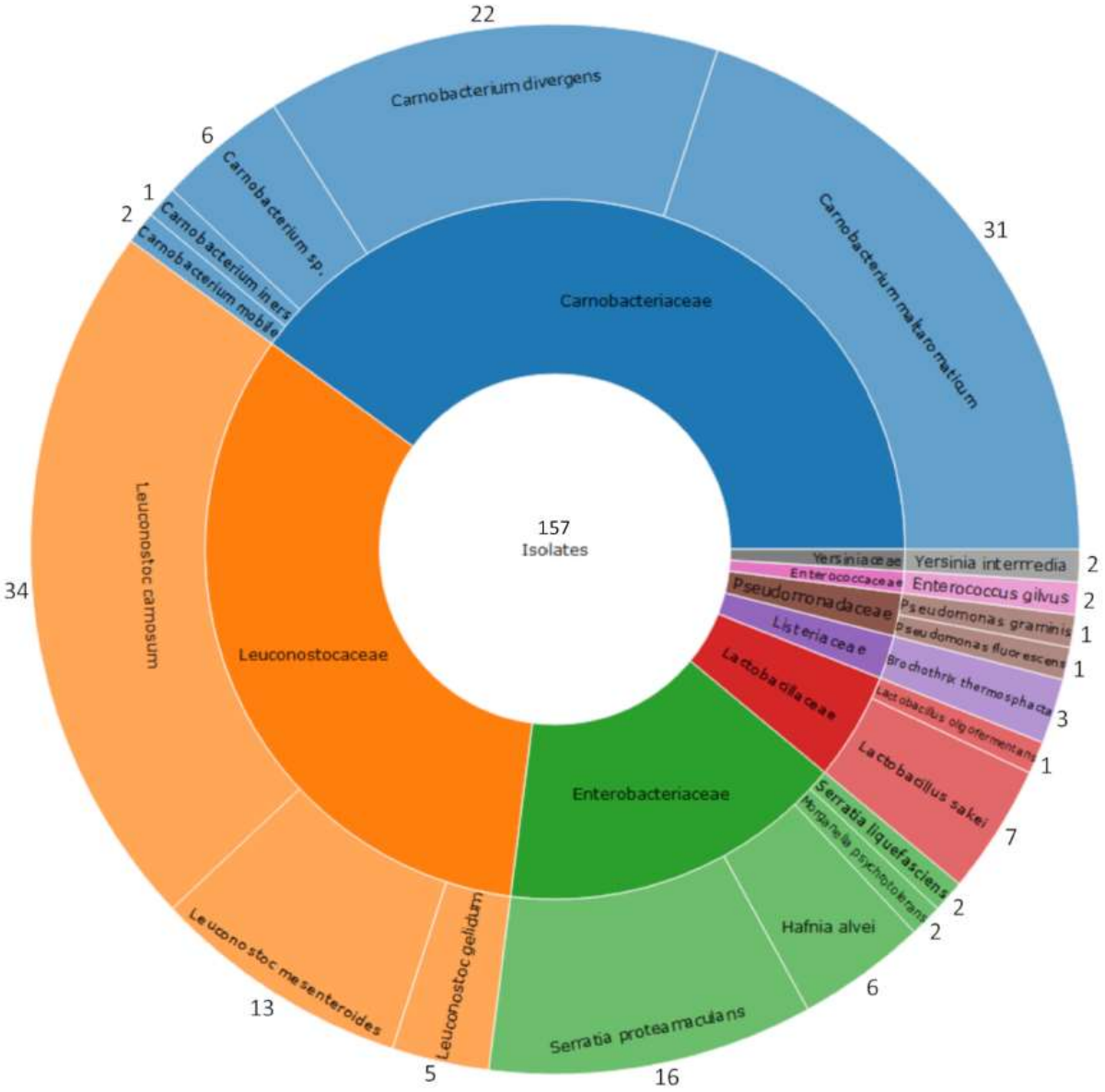


Figure 24 : Bilan de l'identification des isolats étudiés

Pour les espèces les plus abondantes dans les échantillons de jambons, une même espèce était parfois représentée par plusieurs isolats, correspondant potentiellement à différentes souches. La Table 8 établit la traçabilité de ces isolats en fonction des conditions de production.

Table 8 : Tableau comparatif indiquant le nombre d'isolats par campagne d'échantillonnage et par ligne de tranchage.

	Campagne 1		**Campagne 2**		**Campagne 3**		**Campagne 4**	
	Ligne A	**Ligne B**	**Ligne A**	**Ligne B**	**Ligne A**	**Ligne B**	**Ligne A**	**Ligne B**
Carnobacterium divergens	**17**	**-**	**-**	**-**	**1**	**-**	**4**	**-**
Carnobacterium maltaromaticum	**-**	**20**	**1**	**5**	**-**	**2**	**2**	**1**
Carnobacterium sp.	**5**	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Carnobacterium iners	**-**	**-**	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Carnobacterium mobile	**2**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Leuconostoc carnosum	**1**	**21**	**1**	**-**	**1**	**3**	**4**	**3**
Leuconostoc mesenteroides	**12**	**-**	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Leuconostoc gelidum	**-**	**1**	**-**	**-**	**-**	**3**	**-**	**1**
Serratia proteamaculans	**-**	**9**	**-**	**1**	**-**	**4**	**-**	**2**
Serratia liquefasciens	**-**	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**1**
Hafnia alvei	**4**	**-**	**1**	**-**	**-**	**1**	**-**	**-**
Morganella psychrotolerans	**-**	**-**	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**1**
Lactobacillus sakei	**1**	**4**	**-**	**1**	**1**	**-**	**-**	**1**
Lactobacillus oligofermentans	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**1**	**-**
Brochothrix thermosphacta	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**2**	**-**	**1**
Pseudomonas fluorescens	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Pseudomonas graminis	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Enterrococcus gilvus	**2**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Yersinia intermedia	**-**	**-**	**1**	**1**	**-**	**-**	**-**	**-**

Ainsi, nous disposons du matériel biologique nécessaire pour constituer une communauté bactérienne synthétique mimant les communautés naturelles de jambons provenant de l'usine étudiée.

3.3 TOWARDS AN UNDERSTANDING OF HAM ECOSYSTEM BEHAVIOR TO SALT AND NITRITE REDUCTION USING A SYNTHETIC ECOLOGY APPROACH

Marine Zagdoun[1], Méry N'Dione1, Gwendoline Coeuret[1], Marie-Christine Champomier-Vergès[1] and Stéphane Chaillou[1,#].

[1]UMR1319, MICALIS Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay. Jouy-en-Josas. France

[#]Author for correspondence: stephane.chaillou@inra.fr ; INRAE, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas; +331 34 65 21 06

ABSTRACT

Salt and nitrite in hams need to be reduced due to health concerns, but those compounds are key factors to limit bacterial development. Although it is crucial to be able to predict the consequences of such reduction on microbial ecology and ham quality, this is quite challenging considering the bias introduced by contaminations during process. Therefore, we aimed at developing a synthetic ham ecosystem to rapidly acquire knowledge on the impact of salt and nitrite reduction. We designed a sterile ham-like agar with various salt and nitrite concentrations chosen to allow surface response modelling. It was inoculated with a synthetic bacterial community designed with a consortium of nine representative species of hams recently characterized. We allowed bacterial growth and modelled species' population levels and spoilage metabolic productions. Our results revealed an increased disequilibrium of species under a threshold of 12 g/kg of salt and 25-30 mg/kg of nitrite, corresponding to a striking *Leuconostoc* growth, a decreased *Carnobacterium* growth and to a 30 % increase in ethanol and D-lactate production. Finally, this work is a proof of concept that synthetic ecology is a powerful tool to predict the behavior of a microbial community upon a changing in abiotic factors in food.

INTRODUCTION

Cooked ham is a food product that is very popular worldwide but it is also particularly stigmatized by consumers pointing out its negative nutritional value, due to its high salt (NaCl) and nitrite ($NaNO_2$) content. These two chemical compounds are added both for curing meat and for technical purposes. Indeed, salt also limits juice loss during cooking (Pietrasik and Gaudette, 2015) whereas nitrite is also used for keeping a pink coloration of meat (Eakes and Blumer, 1975; Froehlich *et al.*, 1983). However, over the past few years, reducing their incorporation in meat products has become a great matter of concerns for cooked ham producers, considering that sodium overconsumption can cause hypertension (Sanders, 1996; Cappuccio *et al.,* 2000; Caudarella *et al.,* 2009; Ha 2014; Ma Yuan *et al.,* 2015) and that excessive nitrite intake increases the risk of digestive cancer (Larsson *et al.,* 2006; Cross *et al.,* 2010; Chan *et al.,* 2011; Bryan *et al.,* 2012). Because this reduction is likely to modify the microbial ecology of meat products during storage, it is necessary to anticipate to what extent the content of these preservatives could be reduced and to assess the following consequences in terms of meat quality and preservation.

The role of salt addition is mainly to reduce water activity (a_w) of food products, thereby causing osmotic stress and eventually leading to bacterial cell plasmolysis (see Taormina, 2010, for a review). However, the impact of various salt concentrations on growth of meat-borne bacteria may depend on the sensibility of bacterial cells that could vary according to the type of species being present (Chikthimmah *et al.,* 2001; Doyle and Glass, 2009; Taormina, 2010; Aaslyng *et al.,* 2014; Miller *et al.,* 2014; Fougy *et al.,* 2016; Laranjo *et al.,* 2017). Furthermore, meat microbiota usually contains several tenth of bacterial species and the behavior of individual species could be completely different from the one observed in monoculture due to competition phenomenon. For instance, within bacterial communities of sausages, bacon, ham or ready-to-eat meat produced with various salt concentrations (Chikthimmah *et al.,* 2001; Duranton *et al.,* 2012; Miller *et al.,* 2014; Aaslyng *et al.,* 2014; Fougy *et al.,* 2016; Laranjo *et al.,* 2017), it has been shown that the dominant lactic acid

bacteria, comprising many halotolerant species, were not influenced by high salt concentrations (up to 10% in bacon) and outcompeted *Enterobacteriaceae* which were more impacted at those concentrations (Aaslyng *et al.,* 2014). Therefore, these observations are strongly suggesting that salt reduction could lead to various outcomes in terms of meat quality depending on the microbiota present on or in the food product.

Unlike salt, nitrite and its nitroso-compounds derivatives such as nitric oxide are not involved in osmotic stress but contribute to nitrosative stress and act as growth inhibitors either by inactivating metalloproteins, enzymes involved in respiratory chain or by causing cell membranes and DNA injuries (Cammack *et al.,* 1999; Christieans and Majou, 2018). In cooked products, a usual concentration of 120 mg/kg of nitrite is used for its microbial growth inhibition property towards sporulating bacteria that may resist the cooking step, in particular towards the pathogenic bacteria *Clostridium botulinum* (Hospital *et al.,* 2014). Nevertheless, the growth of some spoilage bacterial groups such as *Pseudomonadaceae* or *Enterobacteriaceae* are also inhibited at 75 mg/kg and 150 mg/kg of nitrite respectively in food products such as ham and sausage (Sanz *et al.,* 1997; Birzele *et al.,* 2005; Hospital *et al.,* 2012; Cardinali *et al.,* 2018) indicating a possible effect of nitrite on the growth of spoilage organisms.

Reducing both salt and nitrite content in cooked ham products is thus particularly challenging because the two compounds may act synergistically to reduce microbial growth. Furthermore, the process of cooked ham production is a source of microbiota variability (Geeraerts *et al.,* 2017; Zagdoun *et al.*, 2020), which may increase the difficulty to evaluate the role of both chemical preservatives in the microbial ecology of the product.

In this context, the aim of our present study was to establish an experimental strategy to rapidly acquire knowledge of the consequences induced or triggered by the reduction of both salt and nitrite on ham microbiota behavior. For this purpose, we first designed a synthetic ham bacterial consortium of nine species, constructed from isolates identified recently during a large survey

analysis of cooked ham from a factory located in Europe (Zagdoun *et al*, 2020). This model ham bacterial consortium, was inoculated on a sterile and simplified solid "ham-like" medium mimicking ham recipe with pork juice, glucose, ascorbate and to which various salt and nitrite concentrations were applied. We hypothesized that this synthetic ecology approach would enable an accurate measurement of salt and nitrite influence, without the microbial variability introduced by process. In other words, we aimed at using a simple set up to compare the structure of community and the production of spoilage metabolites at various salt and nitrite concentrations. A response surface experimental design was applied to allow detection of eventual synergistic effect of salt and nitrite on species population levels, pH and spoilage metabolites production in time. Based on those measurements, a model of growth and fermentation-derived spoilage metabolites production according to salt and nitrite concentrations was established.

MATERIALS AND METHODS

Sterile pork juice preparation

Fresh pork loin was blended with sterile water at a concentration of 200 g/L using Robot MC 8000 (Moulinex, Ecully, France) at speed 1 for 30 seconds. Blended pork juice was transferred into a colander to eliminate large meat debris. The obtained juice was centrifuged at 500 x *g* for 3 min at 4°C (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Villepinte, France) to spin down smaller meat debris. Supernatant was then collected and centrifuged at 3000 *x g* for 5 min at 4°C to spin down bacterial cells. A last filtration step using 0.22 µm Stericup filter (Millipore, Molsheim, France) was performed to eliminate residual bacterial cells. The obtained sterile pork juice was stored at 4°C and used within the day for "ham like" agar preparation.

Sterile $NaNO_2$, NaCl, D-glucose and L-ascorbic acid solutions preparation

To fit the experimental design with nine different combinations of salt and nitrite concentrations, nine different solutions (S1 to S9) containing NaCl (100%, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), $NaNO_2$ (>99%, SIGMA ALDRICH, Saint-Quentin-Fallavier, France), D-glucose (>99,5 %, SIGMA ALDRICH, Saint-

Quentin-Fallavier, France), L-ascorbic acid (99,7%, MERCK, Fontenay-sous-Bois, France) and sterile water were prepared. As the volume of those solutions represented 12.5% of the final volume in "ham-like" agar, the concentrations of those solutions were eight times higher than the wanted concentrations in final "ham-like" agar to compensate this dilution factor. Indeed, to obtain a final concentration of 0.5% (wt/wt) D-glucose and 1.2% (wt/wt) ascorbic acid in "ham-like" agar, solutions S1 to S9 were concentrated at 4% (wt/wt) glucose and 9.6% (wt/wt) ascorbic acid. In order to obtain a final concentration of NaCl of 9 g/kg, 10 g/kg, 12 g/kg, 14 g/kg or 15 g/kg in "ham-like" agar, solutions were respectively prepared at 72 g/kg (S5), 80 g/kg (S4, S6), 96 g/kg (S3, S7, S9), 112 g/kg (S2, S8) and 120 g/kg (S1). Likewise, to obtain a final concentration of $NaNO_2$ of 0 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg or 60 mg/kg in "ham-like" agar, solutions were respectively prepared at 0 mg/kg (S7), 80 mg/kg (S6, S8), 240 mg/kg (S1, S5, S9), 400 mg/kg (S2, S4) and 480 mg/kg (S3). Solutions S1 to S9 were adjusted to pH 6 (close to fresh meat pH) with NaOH 1 mM. Finally, these solutions were filtered with 0.22 µm Stericup and stored at 4°C.

Preparation of simplified and sterile "ham like" agar solid medium

Sterile agar solution at 3% (wt/wt) was melted and then cooled around 50°C. In order to facilitate mixing with agar, sterile pork juice was preheated in a water bath (APELEX, JULABO, Seelbach, Germany) to a maximal temperature of 50°C to avoid protein denaturation. Sterile solutions S1 to S9 were respectively diluted four times in preheated sterile pork juice. The obtained solutions were then re-diluted twice in sterile melted agar solution. After homogenization, those solutions were poured on petri dishes in sterile conditions, as shown on Figure S8. Solid "ham-like" agar were stored at 4°C until bacterial inoculation.

Strain collection and DNA extraction

We previously isolated ham colonies grown on MRS, BHI or on Columbia agar with 5% sheep blood (Thermo Fisher Scientific, Illkirch Graffenstaden, France), based on their morphotype. To ease visual distinction of morphotypes, MRS and BHI media were supplemented with Bromocresol green (at 24

mg/L). Isolated strains were respectively inoculated in 5 mL sterile liquid culture media and stored at 8°C using FRIOCELL 55 refrigerated incubator (MMM Medcenter, Planegg, Germany). After 48 h of incubation, bacterial cells were vortexed. From this suspension, 0.9 mL were sampled and supplemented with 0.3 mL sterile glycerol solution (80% wt/wt glycerol) and stored at -80°C in order to constitute a glycerol stock of ham-isolated strains. The rest of the suspension was centrifuged at 3000 *x g* for 5 min to spin down the bacterial cells. Supernatant was eliminated and the bacterial pellets were rinsed in 1 mL of sterile water. After a second centrifugation at 3000 *x g* for 5 min, supernatant was eliminated and bacterial pellets were stored at -20°C for DNA extraction. Bacterial DNA of the different strains was extracted with DNeasy PowerFood Microbial kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturers' instructions and stored at -20°C for PCR identification.

Identification of the bacterial isolates by quantitative PCR

For each isolate, a set of primers targeting nine different species (corresponding to the core species on ham) was tested for species level identification. The sequence of the primers are available in Table S1. Each analysis was performed in duplicate and included a positive control (strain of the targeted species) and a negative control (sterile water). DNA was diluted 10 times to avoid inhibitors effect. PCR mix was composed of 0.4 µL of reverse primer at 10 µM, 0.4 µL of forward primer at 10 µM, 10 µl of SYBR MESA GREEN master mix reagent kit (Eurogentec, Liège, Belgium), 4.2 µL of sterile water and 5 µL of diluted DNA. Quantitative PCR was performed with Realplex thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), using the following program: Taq polymerase activation at 95°C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. It ended with melting-curve checking at 95°C for 15 s, 1 min at 60°C, and 20 min ramp from 60°C to 95°C. A mean threshold cycle (C_t) per sample was calculated out of C_t from the duplicates. Among amplifications with all couples of primers, each strain was identified to the species for which primers allowed the best amplification (meaning with the lowest C_t).

Synthetic bacterial consortium preparation and inoculation on simplified ham

The nine species' isolates chosen for the synthetic community were available in glycerol stock. They were plated on growth agar medium in order to check the presence of eventual contaminations. For each isolate, one colony was picked and grown in liquid broth corresponding to the medium used for initial isolation (MRS of BHI). After incubation overnight at 20°C in FRIOCELL 55 refrigerated incubator, bacterial cell concentration was estimated by optical density (OD) measurement at 600 nm with Visible Light Advanced Spectrophotometer 230 VAC Secomam Prim (Aqualabo, Champigny, France). Knowing the average bacterial cell concentration in each strain broth, a solution of water containing the nine isolates was prepared just before inoculation, with a concentration of 10^5 cfu/mL of each strain. Solid "ham-like" agar disks at various salt and nitrite concentrations were inoculated on the two sides using a sterile spray filled with the solution containing the nine strains. Volume of spray was adjusted in order to inoculate agar at a total bacterial concentration of 10^4 cfu/g. For each salt and nitrite concentrations corresponding to solutions S1 to S8, biological triplicates, corresponding to three inoculated agar, were performed. For the sample corresponding to solution S9, at the center of the experimental design, three additional biological replicates were performed. Inoculated agar were packed under Modified Atmosphere Packaging (50% N_2 / 50% CO_2) with SEINE machine (Milord, Verberie, France) and were stored at 8°C in FRIOCELL 55 refrigerated incubator for 4 days (S9), 6 days (S2, S4, S6, S8), 10 days (S1, S3, S5, S7, S9), 14 days (S2, S4, S6, S8) or 16 days (S9).

Gas and pH measurements

For each sample, O_2 and CO_2 levels were quantified using Oxybaby probe (WITTGAS, Morsang-sur-Orge, France). Then, pH was measured twice per disk (once on each side of the agar disk), using FiveEasy FE20 surface pH probe (Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, Schwitzerland). For each salt and nitrite condition, a mean pH value was calculated out of pH from the three disks.

Microbiota recovery

Independent bacterial extractions were performed on each agar disk. Our protocol was based on that of Fougy and co-workers (2016), adapted as follows: agar disks (~20 g) were rinced in 40 mL of sterile ultrapure water supplemented with 1% Tween 80 (Acros Organics, Waltham, USA) in a stomacher bag (BagPage, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France). After 2 x 30 s homogenizing in a stomacher at maximum speed (LabBlender 400, Gemini B.V., Apeldoorn, Pays-Bas), large debris were filtrated in the stomacher bag and 33 mL of bacterial solution was collected and centrifuged at 500 x *g* for 3 min at 4°C (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Villepinte, France) to spin down the remaining debris. Supernatant was then collected and centrifuged at 3000 x *g* for 5 min at 4°C to spin down bacterial pellet. After bacterial cells were spun down, supernatant of each triplicate was pooled and frozen at - 80°C for further metabolites quantification. Microbial pellets were pooled before washing in 1 mL of sterile ultrapure water. After a last centrifugation at 3000 x *g* for 5 min at 4°C (Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Germany) and supernatant removal, samples were frozen at -20°C for DNA extraction.

End products quantification

Proteins contained in the supernatants were removed using Carrez clarification kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). After successive addition of 600 µL of Carrez reagent I and 600 µL of Carrez reagent II to 5 mL of supernatant in order to precipitate proteins, pH was adjusted between 7.5 and 8.5 (required for enzymatic assays). The precipitate was then spun down by a centrifugation at 5000 x *g* for 20 min, and residual precipitate was then filtrated on 0.22 µm high protein retention Ministart syringe filters (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). Ethanol (K-ETOH), L- and D-lactic acid (K-LAC), acetic acid (K-ACET) and formic acid (K-FORM) concentrations were quantified using Megazyme enzymatic assays (Megazyme Wicklow, Ireland) according to manufacturers' instructions. Absorbance of the solutions was measured using a microplate reader (SYNERGY Mx, BIOTEK, Colmar, France). Final values obtained for metabolites concentrations take into account the

previous dilutions due to the addition of 40 mL of sterile water during bacterial extraction and 1.2 mL Carrez solutions for proteins precipitation.

Bacterial DNA extraction and measurement of total bacterial load and strains population levels by qPCR

Bacterial DNA was extracted with DNeasy PowerFood Microbial kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturers' instructions and stored at -20°C. For each sample, a set of primers targeting all bacteria was used to determine total bacterial load and the set of primers previously used for isolates identification was then used to specifically target the nine different species of the synthetic community. Each analysis was performed in duplicate and included a positive control (strain of the targeted species) and a negative control (sterile water). DNA was not diluted (because some of the samples at the beginning of storage had a low bacterial load) and PCR mix was the same as for isolates identification, as well as the PCR program. Total bacterial load and levels of populations of each species (x) were estimated with the mean threshold cycle (C_t) per sample using the following equation:

(equation 1) $$x = e\left(\frac{Ct-40{,}98}{-1{,}44}\right)$$

This equation, valid for single copy gene probe, resulted from several independent biological replicates of calibration curves previously published (Fougy *et al.* 2016).

Response surface methodology

Response surface followed a second order polynomial regression model, where interactions of third order were neglected:

(equation 2) $$y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1^2 + iX_2^2 + jX_3^2$$

The letter y represents the response (e.g. pH, species population level or metabolites production) and X_1, X_2, X_3 represent the factors: nitrite concentration, salt concentration and time of storage respectively. Unknown coefficients from a to j correspond respectively to interception coefficient (a),

coefficients characterizing the effect of each factors independently (b, c, d), coefficients characterizing the interaction between two factors (e, f, g) and quadratic terms (h, i, j). Those coefficients are determined experimentally, with factors X_1, X_2 and X_3 taking different levels. The levels were chosen using ccd function within R rsm package version 2.10 (Lenth, 2012), as follows: 0, 10, 30, 50, 60 mg/kg for nitrite concentrations; 9, 10, 12, 14, 15 g/kg for salt concentrations, and 4, 6, 10, 14, 16 days for storage time (see Fig. S1). The central experiment (12 g/kg salt - 30 mg/kg nitrite - 10 days storage) was repeated four times in order to obtain a robust statistical modelling. A total number of 18 experiments was needed to complete the regression model equation.

Response surface modelling and statistical analyses

Values taken by the factors in the factorial design at the extremities of the axes were calculated using ccd R function within package rsm version 2.10, by indicating the value of α, the value at the center of the domain and the difference between central value and value at level +1 for the three factors.

The value of α depends on the number of experiments N0 at the center of the domain (here, N0=4), on the number of points Nα at the extremity of the star block (as indicated on Figure 25, Nα =6) and on the number of points at the extremities of the cube Nf (here, Nf=8):

$$\text{(equation 3) } \alpha = \left[\frac{\mathrm{Nf}\left(\sqrt{\mathrm{N0}+\mathrm{Nf}+\mathrm{N\alpha}}-\sqrt{\mathrm{Nf}}\right)^2}{4}\right]^{1/4}$$

Minimum and maximum values $X_{-\alpha}$ and $X_{+\alpha}$ taken by a factor were then calculated as follows: $X_{-\alpha} = X_0 - \alpha\,(X_{-1} - X_0)$ and $X_{+\alpha} = X_0 + \alpha\,(X_0 - X_1)$, with X_{-1}, X_0 and X_1 corresponding respectively to the values taken at levels -1, 0 and +1.

The different values of response according to the levels of factors were coded with the function coded.data within rsm package. We used function rsm to find the adequate coefficients for the regression-scale model according to experimental data and to estimate the influence of the factors. Results of the variance analysis were visualized with summary function. Function contour, within rsm

package was then used to visualize two-dimensional response surface plots. PCA was performed with the function fviz_pca_biplot from Factoextra package version 1.0.5.999.

RESULTS

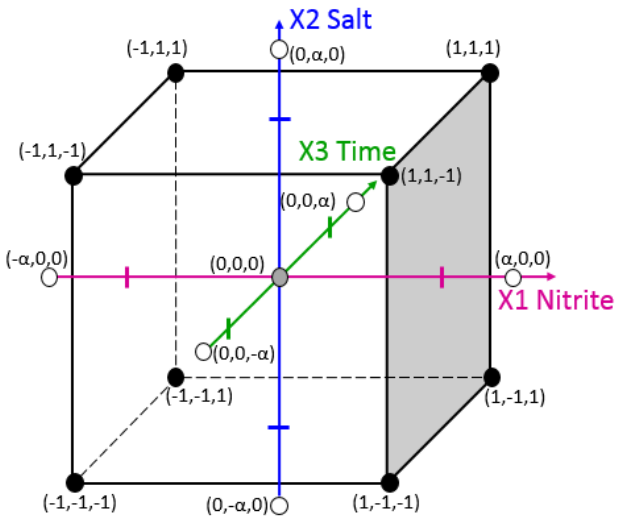
Design of a ham synthetic bacterial consortium and of a solid ham-like agar medium as a simplified representation of ham natural ecosystem

Firstly, we designed a synthetic bacterial community made of nine species representative of the natural microbiota recently characterized on cooked hams produced from a European factory (Zagdoun *et al*, 2020). Isolates (one per species, as detailed in Table S1) were characterized during this previous sampling survey using standard cultivation methods (see *Materials & Methods*) and were further used in our synthetic consortium. In case several isolates were identified as the same species, we chose one, isolated from samples with processing conditions coinciding with increased growth of this species (e.g., for *Serratia proteamaculans*, an isolate was chosen from a sample sliced on line B, with high O_2 packaging permeability). However, our cultural strategy did not allow us to characterize any isolate from the species *Vagococcus fluvialis*, a species belonging to the sub-dominant population in the cooked hams of the aforementioned factory. Therefore, we decided to use a strain isolated from another type of food (Saint Nectaire cheese rinds; Almeida *et al.*, 2014).

Secondly, to test different combinations of salt and nitrite concentrations and to control that the medium was initially sterile, we developed a simplified ham-like solid growth medium (see supplementary Fig. S8). Briefly, its composition was designed as close as possible to the composition of cooked ham using 37.5% (wt/wt) of sterile pork meat juice solidified in 1.5% (wt/wt) agar mimicking thus a ham-like slice, and to which the following ingredients were added: 0.5% (wt/wt) glucose, 1.2% (wt/wt) ascorbate and various salt and nitrite concentrations. Finally, the bacterial consortium was inoculated (sprayed) at a load similar to that found in cooked ham before packaging; each strain being added in equal proportions at a total load of 4 $\log_{10}$ cfu/g of ham-like slice.

Experimental strategy to model the influence of salt and nitrite concentrations on bacterial growth and production of spoilage metabolites during storage time course

Our design comprised three factors (salt concentration, nitrite concentration and time of storage) and several quantitative measurements (concentration of each bacterial species in cfu/g, pH and concentration of lactate, acetate, ethanol and formate). Therefore, instead of performing normal time course, time of storage was integrated as a third variable to study the dynamic evolution of the microbial consortia and to optimize the number of experiments. Surface response methodology was chosen to carefully scatter the experimental points all over the experimental domain (values taken by the factors) in order to have representative measurements of the microbiota functional variations (see Fig. 25). Then, a second order polynomial regression model was used to predict the response at any point of the domain (see equation 2 in *Materials & Methods* for further details). Our choice was to select an orthogonal central composite design because of its capacity to provide an accurate response at the center and the extremities of this experimental domain (Figure 25).



	Levels taken by the factors				
Factors	**-α**	**-1**	**0**	**1**	**α**
X1 Nitrite (mg/kg)	0	10	30	50	60
X2 Salt (g/kg)	9	10	12	14	15
X3 Time (days)	4	6	10	14	16

Figure 25: Experimental set up according to a central composite design with three factors.

Horizontal axis of the cube, in pink, indicates nitrite concentration (increasing order of concentration from left to right); vertical axis in blue indicates salt concentration (increasing order of concentration from the bottom to the top); transversal axis in green corresponds to the days of storage (increasing storage time from the foreground to the background). Each dot represents an experiment, corresponding to a combination of factors. Experimental points can be represented in two blocks: one block of experiments forming a cube, represented by black dots (8 experiments at the tops of the

cube) and another block of experiments forming a star around this cube, represented by white dots (6 experiments at the extremities of the axes). The center of the experimental domain is represented by a grey dot. The experiments à the central point were repeated four times. Each factor took five levels, as indicated in the table on the right. Level 0 represents the center of the domain, levels -1 and +1 represent the values taken for the cubic block, and levels –α and +α represent the values taken for the star bloc. To maintain nearly orthogonality criteria, which allows a good response estimation over the entire experimental domain, we used a value of 1.414 for α (see Materials & Methods section for α calculation).

The highest concentrations of salt (1.5 % or 15 g/kg) and nitrite (60 mg/kg) tested were chosen as they corresponded to already reduced salt concentrations of 25% and nitrite concentrations of 50% compared to those commonly used on the market (ANSES, 2017). Such concentrations, when applied during normal ham production, allow 28 days of storage at which no spoilage usually occurs. They were thus considered as the standard cooked ham concentrations of salt and nitrite from which we applied reduction. In our simplified ham ecosystem, salt concentration was progressively lowered from this high value (15; 14; 12; 10; 9 g/kg), but not completely removed. Again, we took this decision to match the situation of real cooked ham production and the decision of cooked ham producer to keep a certain amount of salt because this compound is also contributing to taste and water retention during ham cooking. On the other hand, nitrite concentration was reduced from the highest value until complete removal (60; 50; 30; 10; 0 mg/kg). Finally, time of storage was chosen so that bacterial load of our synthetic consortium of nine species reached 8 $\log_{10}$ cfu/g at the center of the domain. To reach this goal, pretests on our ham-like simplified medium inoculated with the synthetic bacterial community were performed and showed that this level was generally reached after 10 days of storage at 12 g/kg of salt and 30 mg/kg of nitrite (data not shown). Storage time was thus chosen around this value (4; 6; 10; 14; 16 days) to study both exponential growth and stationary phases. Overall, 15 different experimental points were set up with various combinations of factor levels (see Fig. 25). The central experimental point was repeated four times to increase accuracy of the response model. Furthermore, for each experimental point, we carried out three biological

replicates and measurements of growth, pH and metabolites production. The values used for modeling correspond to the mean values for those replicates.

Salt is the main factor slowing down the dynamic growth of the synthetic microbiota, whereas the effect of nitrite is salt-dependent and increases below the threshold of 25 mg/kg

Data shown in Panel 1 of Figure 26 illustrate how growth dynamics of the microbial community (all species together) was affected by salt concentrations. At a fixed nitrite concentration of 30 mg/kg, the delta in storage time to reach similar population level was about six days between low and high salt concentration. This delta was of a maximum of 2.5 days for various nitrite concentrations and at fixed salt concentration of 12 g/kg (Figure 26; Panel 2). In addition, the delta storage time was not regular over the nitrite concentration range. Furthermore, from the results shown in panel P3 of Figure 26 and at a fixed storage time of 10 days, we observed that there was a positive interaction of both salt and nitrite (diagonal curves on the lower left corner of panel 3, below the threshold of 12 g/kg and 25 mg/kg of salt and nitrite respectively). Due to this interaction, the population level of the bacterial community reached a delta of 1.2 $\log_{10}$ cfu/g, a range much higher than in samples with higher concentrations (in which the delta is about 0.4 $\log_{10}$ cfu/g only).

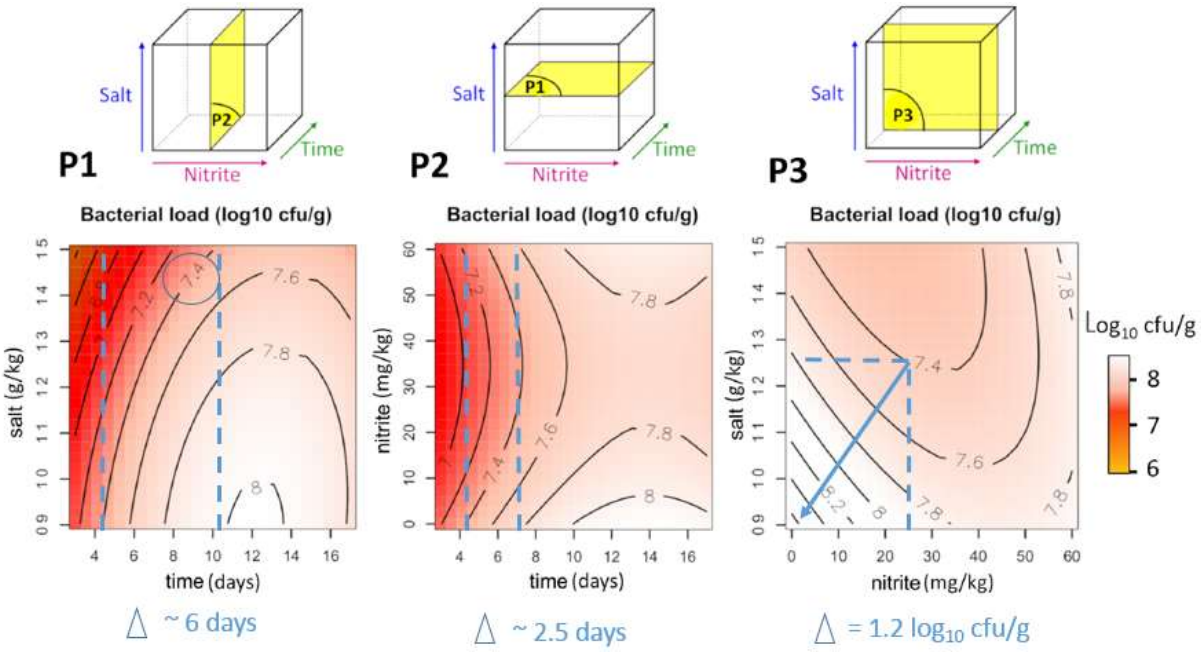


Figure 26: Response surface modeling of total bacterial load in log10 cfu/g according to the three factors studied.

*Panel **P1**: representation of bacterial load for a fixed nitrite concentration of 30 mg/kg, as a function of salt concentration and time of storage. Panel **P2**: representation of bacterial load for a fixed salt concentration of 12 g/kg, as a function of nitrite concentration and time of storage. Panel **P3**: representation of bacterial load for a fixed time of storage of 10 days, as a function of salt concentration and nitrite concentration. Modeling curves were drawn every 0.2 log $_{10}$ cfu/g. Stripped lines are indicating the various delta observed in each panel.*

More interestingly, when we tried to discriminate the nine species based on their growth dynamic behavior upon the various salt and nitrite concentrations, we were able to distinguish three main patterns of response (see Figure 27). Interestingly, we noticed that species from the same genus showed a similar response, with for example the three *Leuconostoc* species following pattern A and the two *Carnobacterium* species following pattern B.

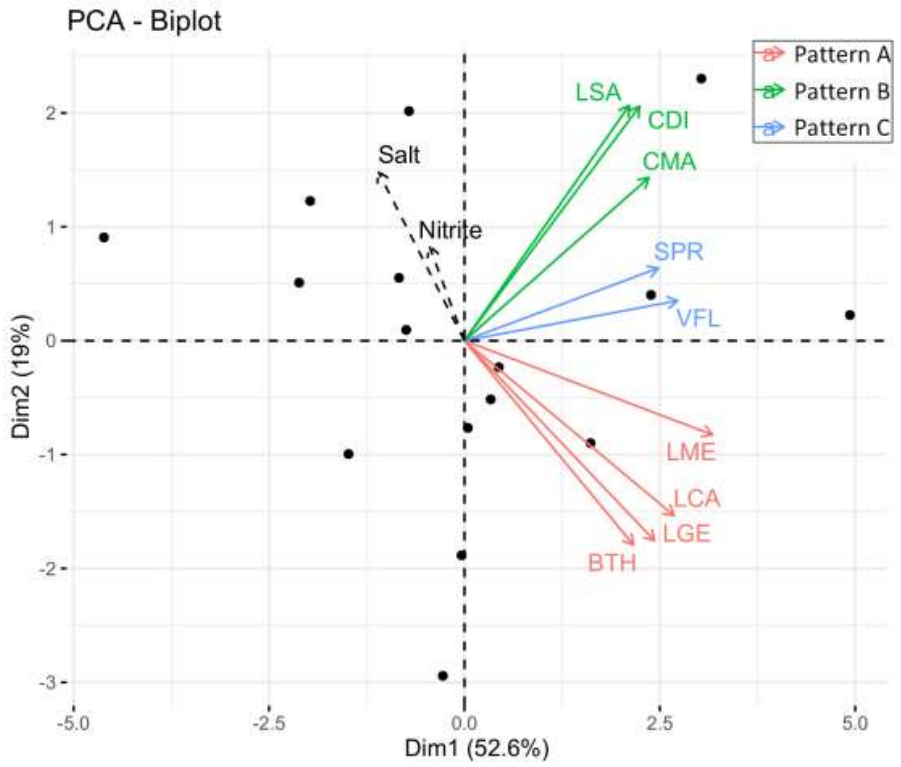


Figure 27: Discriminant analysis of ham-like samples using principal component analysis and the population level of each individual species within the synthetic community.

Each black dot represents one of the fifteen ham-like samples. Samples were grouped according to their bacterial communities. The loading plot represents active variables by continuous arrows (species) and non-active variables by dotted arrows (salt and nitrite). Species names are abbreviated as follows: BTH for B. thermosphacta; CDI for C. divergens; CMA for C. maltaromaticum; LCA for L. carnosum; LGE for L. gelidum; LME for L. mesenteroides; LSA for L. sakei; SPR for S. proteamaculans and VFL for V. fluvialis. Arrows in red, corresponding to pattern A represents species rather present in samples with low salt and nitrite concentrations. Arrows in green, corresponding to pattern B represent species rather present in samples with high salt and nitrite concentrations. Arrows in blue corresponding to pattern C represent species not influenced or weakly influenced by salt and nitrite.

Figure 28 shows in more details the modeling of the population level of the nine species according to the three patterns.

Species following pattern A, comprising among others the three dominant *Leuconostoc* species, showed a growth behavior similar to that described above in Figure 27. In other words, the growth rate of the three species was strongly accelerated at low salt and nitrite concentrations, leading to a delta of storage time around six days to reach similar population level and a delta of more than 1.2 log_{10} cfu/g below the threshold of 12 g/kg of salt and 25 mg/kg of nitrite. The fourth species from

pattern A, *Brochothrix thermosphacta*, was subdominant in our simplified ham ecosystem and showed a very strong decrease in growth potential at high salt and nitrite concentration.

Species following pattern B, in particular the two *Carnobacterium* species, displayed two different growth behavior during storage time. The first behavior, observed before 12 days of storage, was somewhat similar to species of pattern A with an accelerated growth upon salt and nitrite reduction. The second behavior, observed during the stationary phase of growth after 12 days of storage indicated a strong decrease in population level at low salt concentration (delta of – 1 $\log_{10}$ cfu/g below 1.2 g/kg of salt), whereas a higher population of these species can be maintained at higher salt concentration. This trend was slightly different for the third species classified in pattern B, *L. sakei*, whose growth pattern was positively affected by either salt and nitrite, this species reaching its higher population level at the highest concentrations of both compounds (see panel 3 of Figure 28).

Finally, species following pattern C were not forming a homogeneous group, as the growth dynamics of *V. fluvialis* was poorly affected by changes in the concentrations of salt and nitrite, whereas the growth of *S. proteamaculans* was significantly improved at high nitrite concentrations with a delta of +1 $\log_{10}$ cfu/g between 30 and 60 mg/kg of nitrite (see panel P2, and panel 3 of Figure 28).

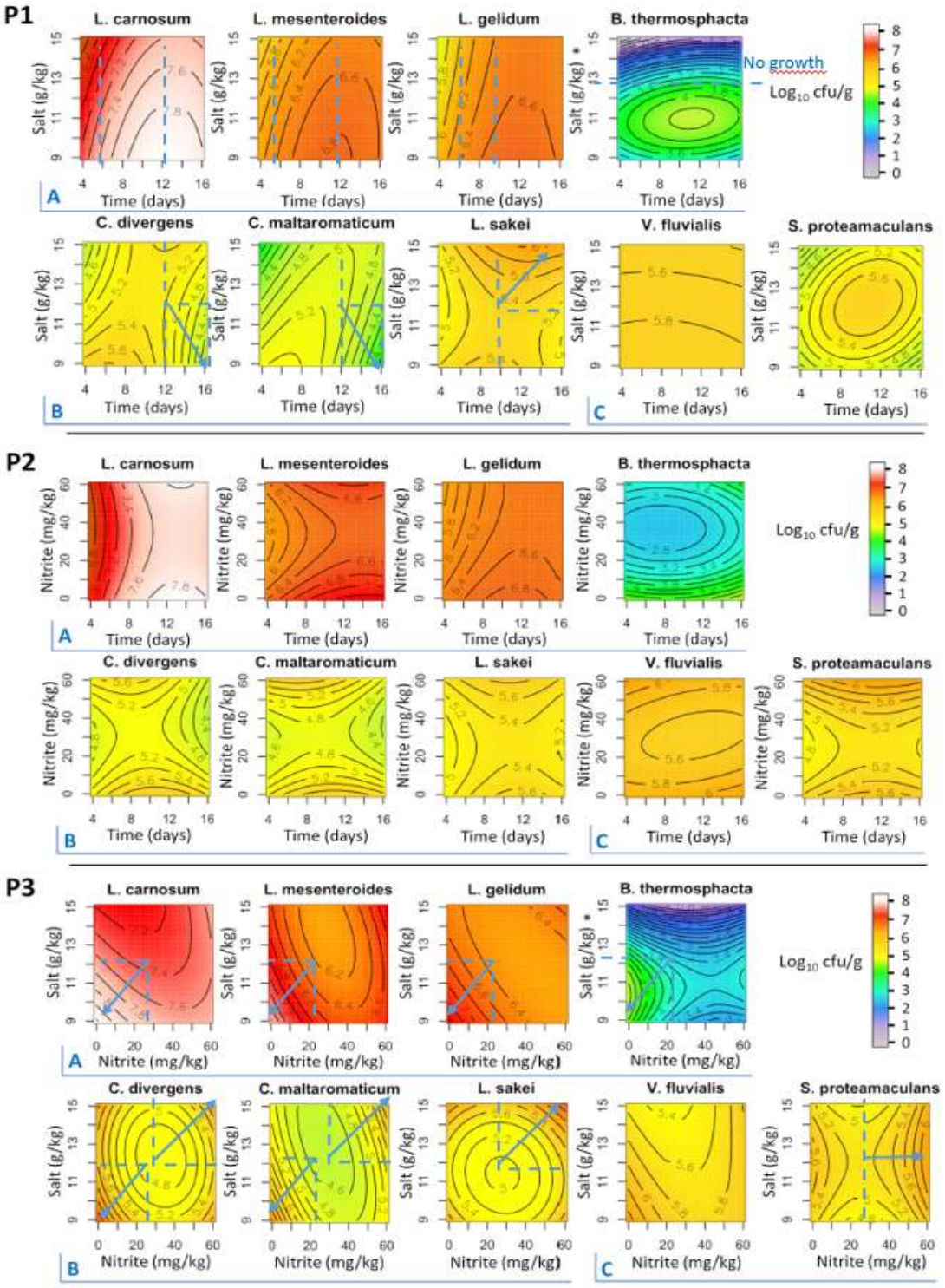


Figure 28: Response surface modeling of species levels of population within the synthetic community.

For each panel, species are grouped according to their pattern of response to salt and nitrite reduction. Patterns A, B and C are indicated in blue letters under each group of species. Species load is represented on panel P1 for a fixed nitrite concentration of 30 mg/kg, as a function of salt concentration and time of storage. Panel P2 represents species load for a fixed salt concentration of 12 g/kg, as a function of nitrite concentration and time of storage. Finally, panel P3 represents bacterial load for a fixed time of storage of 10 days, as a function of salt concentration and nitrite

concentration. Significance of the effect of factors on the response was calculated with ANOVA and ● indicates p-value < 0.1.

Simultaneous salt and nitrite reduction increases the level of heterolactic fermentation-derived products due to the increased *Leuconostoc* population

At 16 days of storage, D-lactic acid was the main fermentation product, followed by ethanol, L-lactic acid, acetic acid and formic acid, in decreasing amounts of production (see Figure 29). During storage, pH decreased from 6 (day 0) to 4.2 (day 16) but this decrease was not affected significantly by salt and nitrite concentrations.

However, from Figure 29, we could demonstrate that D-lactic acid and ethanol were the two fermentation products which production was changed by the various concentration of the two preservative compounds but only after 10 days of storage (stationary phase). The production of D-lactic acid was modified by low salt concentration below the threshold of 12 g/kg. For a fixed nitrite concentration of 30 mg/kg, its production was increased by 25 % between low and high salt concentrations (see panel P1). Conversely, ethanol production was increased of about 30 % below the threshold of 30 mg/kg of nitrite and for a fixed a fixed concentration of 12 g/kg of salt. As shown for *Leuconostoc* growth dynamics, ethanol production was increased by the co-reduction of both salt and nitrite (see panel 3 of Figure 29). Unlike D-lactic acid and ethanol, the production of L-lactic acid and of acetic acid were more elevated at mean salt (for L-lactic acid) and nitrite (for acetic acid) concentrations, without any clear link to the population level of one of the bacterial groups.

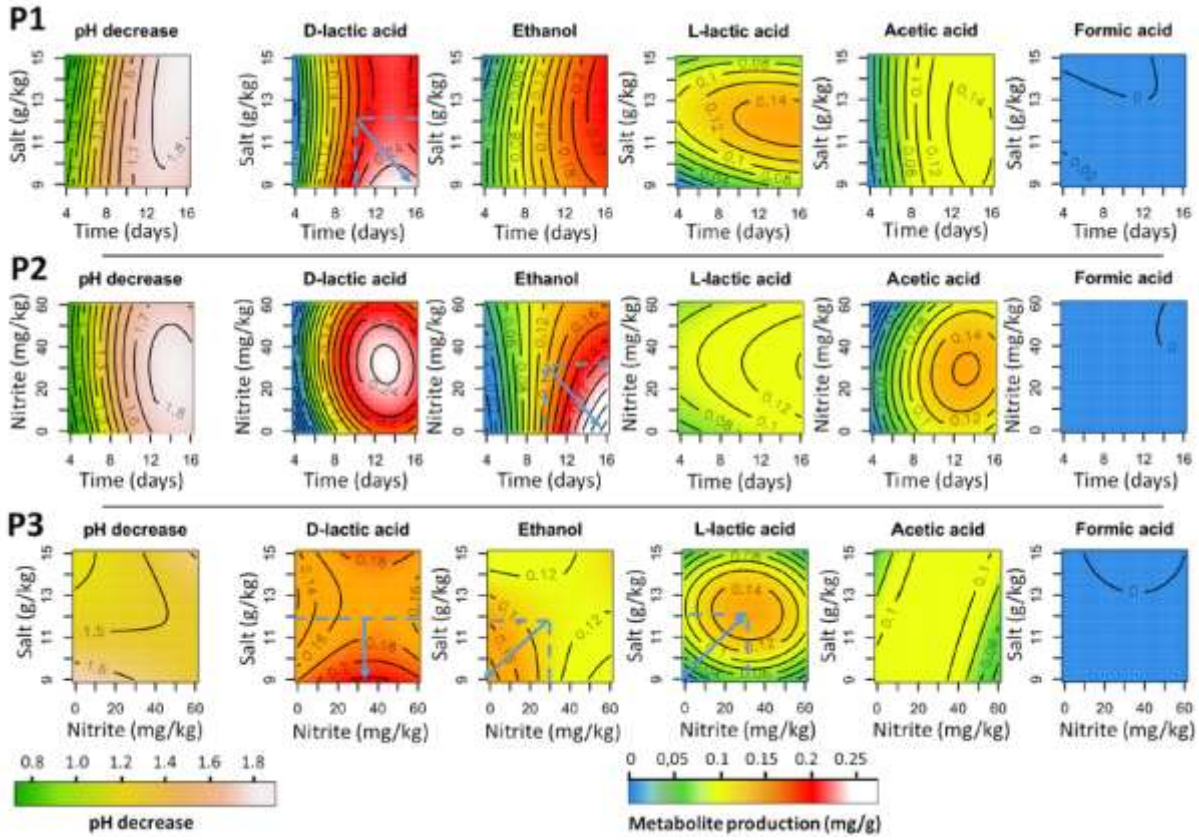


Figure 29: Response surface modeling of pH decrease and pyruvate-derived metabolic productions.

*End products are ordered from left to right in decreasing amount of production. On panel **P1**, pH decrease (corresponding to the difference between pH at the beginning and pH at the end of the storage) and metabolic productions are represented for a fixed nitrite concentration of 30 mg/kg, as a function of salt concentration and time of storage. They are represented on panel **P2** for a fixed salt concentration of 12 g/kg, as a function of nitrite concentration and time of storage. Finally, they are presented in panel **P3** for a fixed time of storage of 10 days, as a function of salt concentration and nitrite concentration.*

DISCUSSION

The aim of this study was to apply a statistical modeling approach using a composite central design to estimate the impact of salt and nitrite reduction on a simplified cooked ham ecosystem. We focused our analyses on the dynamic growth during storage time of nine bacterial species, selected for being a representative ham community identified recently from a European cooked ham Factory (Zagdoun *et al.*, 2020). More generally, we have sought to identify the potential interactions (*i.e.* the synergistic effect) of both chemical preservatives on bacterial growth and spoilage metabolic productions.

The first finding of our work was to demonstrate that several patterns of response were observed among the microbiota. In particular, *Leuconostoc* species (*L. carnosum*, *L. gelidum* and *L. mesenteroides*) were those having a striking accelerated growth dynamic upon reduction of both preservatives. This phenomenon was connected to higher accumulation (up to 30 %) of D-lactid acid and ethanol at the end of storage time. We also show that reduction of salt and nitrite decreases species evenness. For example, the competitive fitness of *Carnobacterium* species (*C. divergens* and *C. maltaromaticum*) decreased at low salt concentration and from the beginning to the end of storage, outcompeted then by *Leuconostoc* species. This shift in population has already been described by Jääskeläinen and co-workers (2016), who showed that in raw beef *Carnobacterium* species, unless abundant at the beginning of storage, could be progressively dominated during storage time by *Leuconostoc* or *Lactobacillus* species. Our data, presented here suggest that salt concentration above 12 g/kg may maintain higher equilibrium of both groups of bacteria and thus would be important to maintain a lower production of ethanol.

As demonstrated in recent studies (Raimondi *et al*., 2018, Zagdoun *et al*., 2020), ethanol is the main volatile organic compound produced from cooked ham microbiotas. This molecule is thus an important spoilage marker. The specific role of nitrite in lowering the level of ethanol production by our synthetic community and most likely by the *Leuconostoc* population is of particular interest for cooked ham producers. More generally, the fact that salt and nitrite reduction induced a shift from homolactic fermentation (L-lactic acid production at high salt concentrations or D-lactic acid at high nitrite concentrations) to heterolactic fermentation products (D-lactic acid, ethanol, acetic acid) highlights the role of these chemicals in maintaining lower spoilage activity by the microbiota.

Among the possible explanations to the fact that ethanol (and to lesser extent acetic acid) were rather produced at low nitrite concentrations could be that fermentation was re-directed in order to maximize energy production needed for *Leuconostoc* growth. In fact, pyruvate fermentation in D-lactate by D-lactate dehydrogenase regenerates one NAD+ only, while the yield of generated NAD+ is

doubled when pyruvate decarboxylation in acetyl-coA is followed by the production of one molecule of ethanol (two NAD+) and one molecule of acetic acid (1 ATP). Cole and Brown (1980) reported similar behaviour of *Echerichia coli*, with increased productions of ethanol in absence of nitrite. However, for *Enterobacteriaceae*, the explanation of such shift could be different than for *Leuconostoc* because this group of Proteobacteria has a cytosolic nitrite reductase allowing the regeneration of NADH in NAD+ using nitrite as electron acceptor. In absence of nitrite, NADH reoxidation is more efficient via acetate and ethanol production than via D-lactate productions, which compensates nitrite reductase inactivity. Such shift has indeed already been reported in previous studies as depending on internal redox steady state ratio NADH/NAD+ (de Graef *et al.*, 1999; Garrigues *et al.*, 1997).

Therefore, one of the reasons why both salt and nitrite reductions would particularly affect ethanol production could be linked to an improvement of NADH reoxydation by obligate heterolactic bacterial species (in this study, namely by *Leuconostoc*).

Our second most interesting finding, obtained with the use of statistical modelling, was to demonstrate that the effect of salt and nitrite on the microbiota was not following a linear relationship. The interaction of both chemical increases below a threshold of 12 g/kg of salt and 25-30 mg/kg of nitrite. This result suggests that below these values, spoilage of cooked ham may be strongly increased.

Therefore, the next step of our analysis will be to deploy our experimental design to the scale of an industrial production in order to see if the response obtained in our simplified ecosystem would fit that of hams from a production chain within a factory. As already mentioned in our introduction, the microbiota of cooked ham is strongly influenced by the process parameters of production, leaving an uncertainty on how different microbiota would respond to the reduction of salt and nitrite. However, we believe that our strategy is an interesting 'proof of concept' tool to predict the behavior of a

controlled microbial community upon a changing in two abiotic factors in food before testing such analysis in industrial conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank ANRT of Ile de France region (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) for their financial support by providing CIFRE grant number 2016/1038 to Marine ZAGDOUN.

SUPPLEMENTARY DATA

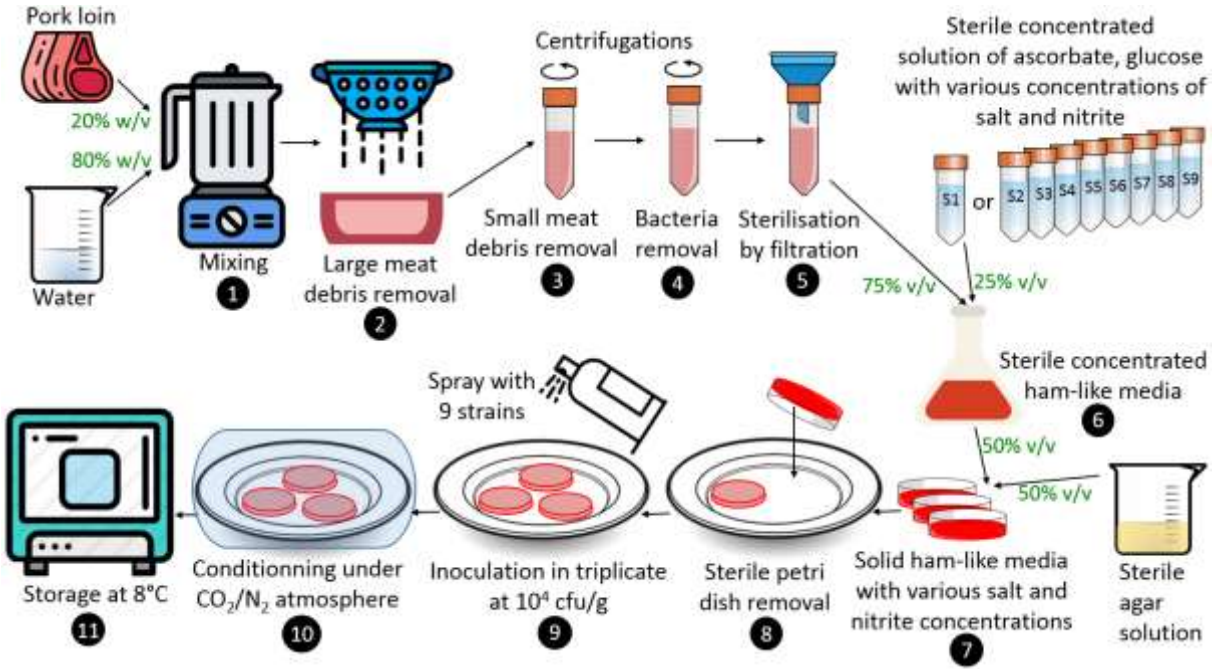


Figure S8: Design of a sterile ham-like growth medium inoculated with the synthetic community. After mixing fresh pork loin at 200 g/L in water (step 1), large meat debris were removed by filtration in a colander (step 2). Filtered meat juice was then centrifuged to remove smaller meat debris (step 3) and supernatant was centrifuged again to spin down eventual bacterial cells (step 4). Lastly, residual bacterial cells of the supernatant were removed by filtration with 0.22 µm sterile filters (step 5). Sterile eight-time-concentrated solutions with different combinations of salt and nitrite concentrations (labeled from S1 to S9, for the nine tested combinations of concentrations) were then added in nine independent flasks of sterile meat juice (step 6). Concentrated sterile ham-like medium was then homogenized with sterile preheated agar juice and poured into petri dishes (step 7). For each experimental point, three agar disks, corresponding to biological replicates, were removed from the petri dish (step 8) and placed as ham-like slices onto a plastic plate. Then, they were inoculated at a total bacterial load of 10^4 cfu/g (step 9) with a solution containing nine strains in equal proportions. Inoculation was set up with a spray on each side of the disk. The inoculated agar disks were finally packed under 50/50 CO_2/N_2 modified atmosphere packaging (step 10) and stored in an incubator at 8°C until sampling (step 11).

Table S1: Characteristics and isolation conditions of the isolates used for the design of the ham synthetic bacterial community.

Species	Isolate name	Reference	Growth medium	Biosample (from Zagdoun *et al*, 2020)	Primers used for species identification and qPCR quantification			
					Target gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Primer reference
Leuconostoc carnosum	HMQ1-1-J1L02AP-A	This study	MRS	Ham from sampling campaign 1, slicing line B, with high O_2 packaging permeability	*rpoA*	QPVS-05LCA-F	GATTGATTCAGATGAGGAACGTGTT	Fougy et al., 2016
						QPVS-05LCA-R	CGCACCTGCTTGTAAATCAGCT	Fougy et al., 2016
Leuconostoc gelidum subsp gelidum	HMQ3-1-J6L02AP-I	This study	MRS	Ham from sampling campaign 3, slicing line B, with high O_2 packaging permeability	*rpoA*	QPVS-05LGE-F	AGAACGAAGCCTTGAAGTTGATA	Fougy et al., 2016
						QPVS-05LGE-R	CTGCTACGGTTGCAATATGTAG	Fougy et al., 2016
Leuconostoc mesenteroides	HMQ1-1-J5L17AE-C	This study	MRS	Ham from sampling campaign 1, slicing line A, with low O_2 packaging permeability	*rpoA*	QPVS-05LME-F	CTTCGCTTCCTGGCGCAGCC	Fougy et al., 2016
						QPVS-05LME-R	CCACGGTTGAAAACTCGTGAA	Fougy et al., 2016
Lactobacillus sakei	HMQ1-1-J6L02AE-A	This study	MRS	Ham from sampling campaign 1, slicing line B, with low O_2 packaging permeability	*katA*	QMF01-F	CTGGCTATCCCGATACATACC	Chaillou et al., 2014
						QMF01-R	GCATATCTTGGCTACGGGCA	Chaillou et al., 2014
Carnobacterium divergens	HMQ1-1-J4L17AP-D	This study	BHI	Ham from sampling campaign 1, slicing line A, with high O_2 packaging permeability	*rpoA*	QPVS-05CDI-F2	CTTGCATAACCTCTTCCTGATTTT	Fougy et al., 2016
						QPVS-05CDI-R2	TGATGGCGTTGTTGAGGATGTAACT	Fougy et al., 2016
Carnobacterium maltaromaticum	HMQ1-1-J1L02AP-D	This study	BHI	Ham from sampling campaign 1, slicing line B, with high O_2 packaging permeability	*rpoA*	QPVS-05CMA-F2	CTTGCATAACCTCTACCTTGTTTC	Fougy et al., 2016
						QPVS-05CMA-R2	CGATGGGGTTGTAGAAGATGTGACA	Fougy et al., 2016
Serratia proteamaculans	HMQ1-1-J8L02AP-A	This study	BHI	Ham from sampling campaign 1, slicing line B, with high O_2 packaging permeability	*fusA*	QEBP-SPR-02F	TGGCTATCGGCGCAGAAGAGAAA	Fougy et al., 2016
						QEBP-SPR-02R	GTTCTTGCATATCAGCCGGGATC	Fougy et al., 2016
Brochothrix thermosphacta	HMQ3-1-J1L02AP-A	This study	BHI	Ham from sampling campaign 3, slicing line B, with high O_2 packaging permeability	*rpoC*	QSF03BTH-F	GGACCAGAGGTTATCGAAACATTAACTG	Fougy et al., 2016
						QSF03BTH-R	TAATACCAGCAGCAGGAATTGCTT	Fougy et al., 2016
Vagococcus fluvialis	bH819	Almeida et al., 2014	BHI	Saint-Nectaire cheese rinds	*tuf*	QPVSENT-F	TACTGACAAACCATTCATGATG	Ke et al., 1999
						QPVSENT-R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC	Ke et al., 1999

3.4 POINTS A RETENIR

Dans ce chapitre, nous avons montré que les espèces au sein de la communauté synthétique suivent différents schémas de réponses à une réduction de sel et de nitrite. Nous avons observé qu'une réduction de sel et de nitrite accélérait la croissance des *Leuconostoc* (*L. camosum*, *L. gelidum* et *L. mesenteroides*) et que ce phénomène était corrélé avec une production plus importante d'acide D-lactique et d'éthanol en fin de stockage.

Nous avons identifié qu'une réduction de sel en dessous du seuil de 12 g/kg, réduisait globalement l'équitabilité des abondances (*evenness*) des espèces. Cela s'explique principalement par le fait que les *Camobacterium* (*C. divergens* et *C. maltaromaticum*) sont moins compétitifs en fin de stockage à ces teneurs réduites. Or, le maintien d'un niveau de population élevé des *Carnobacterium* permet de limiter le développement des *Leuconostoc* et limite ainsi la production d'éthanol, métabolite d'altération.

Nous avons montré qu'une réduction de sel et de nitrite était corrélée à un changement de métabolisme, initialement d'une fermentation homolactique (caractérisée par la production d'acide L-lactique et D-lactique à des concentrations élevées en sel et en nitrite respectivement) vers une fermentation hétérolactique (acide D-lactique, éthanol et acide acétique aux faibles concentrations en sel et en nitrite).

Enfin, nous avons montré qu'une réduction de sel et de nitrite n'avait pas un effet linéaire sur les niveaux de population ou sur la production de métabolites d'altération. L'effet d'interaction du sel et du nitrite est particulièrement marqué en dessous de 12 g/kg de sel et en dessous de 25-30 mg/kg de nitrite. Ces résultats suggèrent qu'en dessous de ce seuil, il est possible que l'altération des jambons soit plus importante en condition de production.

A l'issue de cette étude, nous allons déployer ce plan expérimental en conditions de production pour voir si les résultats observés dans cet écosystème simplifié sont similaires à ceux qui pourraient être observés dans des jambons.

4 IMPACT D'UNE REDUCTION DE SEL ET DE NITRITE SUR LE COMPORTEMENT DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE JAMBONS INDUSTRIELS

4.1 CONTEXTE ET OBJECTIF

Pour étudier l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur le comportement des différentes communautés des jambons, nous avons dans une première étude (présentée dans le chapitre 3) développé un écosystème de jambon simplifié pour nous affranchir de la variabilité microbienne induite par les différentes étapes de production. Nous avons observé un déséquilibre des abondances des différentes espèces dans la communauté bactérienne synthétique en dessous du seuil de 12 g/kg de sel et de 25-30 mg/kg de nitrite, qui s'accompagne d'une augmentation de la production de métabolites d'altération.

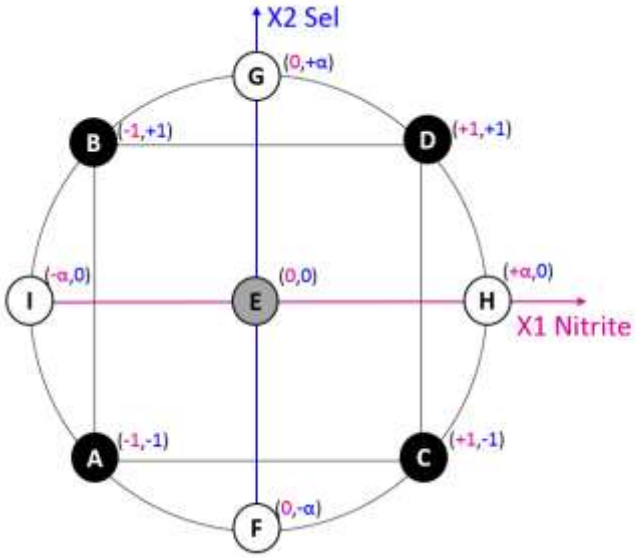
Dans une deuxième étude, présentée dans ce chapitre, nous avons réintroduit la variabilité liée aux étapes de production et avons pour objectif d'étudier l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur la structure des communautés de jambons et sur la production de métabolites d'altération. Comme nous avons précédemment mis en évidence l'effet de la ligne de tranchage sur la structure des communautés, nous avons choisi de tester une réduction de sel et de nitrite sur des jambons issus des deux lignes de tranchage.

Nous avons donc mis en place un plan d'expériences prenant en compte les facteurs concentrations en sel et en nitrite et leurs potentielles interactions. Nous nous sommes placés à un temps de stockage de 28 jours, correspondant à la DLC des jambons de type standard étudiés dans le chapitre 2. Il est à noter que dans le cas de jambons à teneurs en sel et en nitrite réduites par rapport à ces teneurs standards, nous ne pouvons pas parler de DLC car la durée de conservation est susceptible de varier selon les teneurs testées. Dans cette étude, nous avons mis en œuvre la même stratégie pour l'analyse des communautés microbiennes et avons utilisé la même approche pour le dosage des métabolites que dans le chapitre 2.

4.2 MATERIELS ET METHODES

Stratégie expérimentale

La viande crue utilisée pour la production de jambons était originaire d'un même abattoir. Après désossage, elle a été transportée sous vide jusqu'à l'usine de production et conservée pendant une durée variant de 4 à 6 jours. La viande a ensuite été saumurée avec une saumure différente pour chaque point d'essai afin d'atteindre une concentration finale dans les jambons de 5 mg/g de glucose, 0,3 mg/g d'ascorbate de sodium et différentes combinaisons de concentrations en sel (variant entre 9 et 19 g/kg) et en nitrite (variant entre 0 et 60 mg/kg) indiquées sur la Figure 30. Dans chaque saumure, la quantité de sel nitrité (correspondant à du nitrite à 0,6 % m/m, dilué avec du sel fin) a été ajustée pour obtenir la concentration en nitrite désirée. Un ajout de sel fin a permis de compléter la quantité de sel déjà incorporée *via* le sel nitrité afin d'obtenir la concentration en sel voulue. Pour chaque essai, la viande saumurée a été barattée selon un barattage standard rapide (12 h à 4 °C), puis moulée en pains de viande individuels et cuits à 70 °C à cœur. La cuisson a été suivie d'une phase de refroidissement et de stockage en frigo à 4 °C pendant une durée variant entre 4 et 6 jours (voir Figure 31). Pour chaque point d'essai, une partie des pains de viande a été tranchée sur la ligne A et l'autre partie sur la ligne B. Un emballage avec une perméabilité à l'O_2 élevée de 16,3 $cm^3.m^{-2}.10^5$ Pa par jour, a été utilisé pour l'emballage sous atmosphère modifiée (50 % CO_2/50 % N_2).



	Niveaux des facteurs				
Facteurs	**-α**	**-1**	**0**	**+1**	**+α**
X1 Nitrite (mg/kg)	0	10	30	50	60
X2 Sel (g/kg)	9	11	14	17	19

Figure 30 : Plan d'expériences selon un plan composite centré à deux facteurs.

L'axe horizontal en rose indique la concentration en nitrite (ordre de concentration croissant de gauche à droite) ; l'axe vertical en bleu indique la concentration en sel (ordre de concentration de bas en haut). Chaque point représente un point expérimental correspondant à une combinaison des facteurs. Les points expérimentaux peuvent être représentés en deux blocs d'expériences : un bloc en carré (4 expériences indiquées en noir), un autre en étoile (4 expériences indiquées en blanc). Le centre du domaine expérimental est indiqué par un point gris. Le point expérimental au centre a été répété 4 fois. Chaque facteur a pris cinq niveaux dont la valeur numérique est précisée dans le tableau de droite.

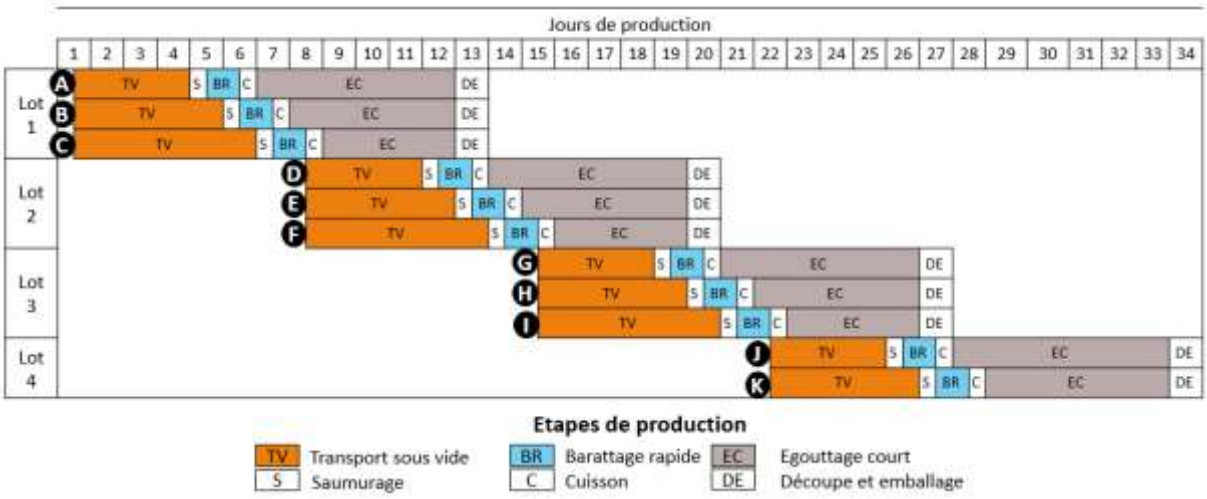


Figure 31 : Organisation de l'échantillonnage pour répondre aux contraintes de production.

La durée des différentes étapes de production est représentée pour les différents lots de viande. Les points A à K correspondent aux différents points d'essai réalisés.

Conditions de stockage des échantillons

L'usine de production étant éloignée géographiquement du laboratoire d'analyse, des échantillons contrôles (T_0) ont été stockés à -20 °C directement après emballage et envoyés congelés au laboratoire. Les autres échantillons ont été envoyés au laboratoire immédiatement après emballage par transport réfrigéré (deux jours à 4 °C). Ils ont ensuite été placés dans une étuve FRIOCELL 55 (MMM Medcenter, Planegg, Allemagne) pour cinq jours supplémentaires de stockage à 4 °C, puis à 8 °C pour les 21 jours de stockage restants. A la fin du stockage, tous les échantillons ont été congelés à -20 °C en attendant d'être analysés.

Mesures de gaz, de pH, de chromamétrie et observation de défaut visuels

A 28 jours de stockage, des mesures de gaz et de pH ont été réalisées selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Pour chaque essai, les valeurs de pH représentent une moyenne de huit mesures (deux mesures par échantillon sur quatre échantillons différents). Des mesures de chromamétrie (CR100; Minolta, Carrières-sur-Seine, France) ont également été réalisées et, de même que pour le pH, les valeurs L, a et b correspondent à une moyenne de huit mesures (deux mesures par échantillon sur quatre échantillons différents). Pour chaque échantillon, nous avons observé la présence d'éventuels défauts d'altération de type colonies blanches avant l'extraction des bactéries.

Analyse des communautés bactériennes et quantification des métabolites issus de la fermentation du pyruvate

Pour des précisions concernant l'extraction des bactéries, la quantification de la charge bactérienne, l'extraction de l'ADN, la PCR pour amplification du gène *gyrB*, la purification, la quantification des produits de PCR, la préparation des librairies pour le séquençage MiSeq Illumina, les contrôles qualité, le traitement des données de séquençage et le dosage des métabolites, se référer à la section *Materials and Methods* du chapitre 2.

Recherche des levures et collecte des levures cultivables

Pour chaque point d'essai, les levures ont été recherchées sur milieu YPDA (*Yeast Peptone Dextrose Agar*) supplémenté avec des antibiotiques pour limiter la croissance de bactéries (80 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL d'ampicilline). Les colonies de levures ont été dénombrées après 72 h d'incubation aérobie à 20 °C. Pour les échantillons présentant des levures, les colonies présentes sur les boîtes ont été collectées par suspension dans 1 mL d'eau physiologique stérile. Cette étape de collecte de levures a ensuite été suivie par une étape de centrifugation pendant 3 min à 3000 x *g*. Le surnageant a été éliminé par renversement et le culot de levures a été directement collecté pour extraction d'ADN.

Extraction de l'ADN des levures cultivables et contrôle qualité

L'extraction de l'ADN de levures a été réalisée selon un protocole adapté de Hoffman et Winston (1987). Dans chaque culot de levures, 0,3 mL de tampon de lyse (Tris 10 mM, pH8 ; EDTA 1 mM ; NaCl 100 mM ; triton 2 % ; SDS 1 %), 0 ,3 mL de phénol : chloroforme (5 : 1), pH 4 (P1944, Sigma) et 0,3 g de billes de verre (0,1 mm, 079052, Dutscher) ont été ajoutés. L'étape de lyse cellulaire à l'aide d'un agitateur vortex à vitesse maximale pendant 3 à 4 min a été suivie d'une centrifugation pendant 5 min à 3 000 x *g* pour culotter les débris cellulaires. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN a ensuite été collectée par pipetage. Pour précipiter l'ADN, 1 mL d'éthanol 100 % a été ajouté à ce surnageant. Après homogénéisation par retournement, le culot d'ADN a été centrifugé à vitesse maximale de 20 000 x *g*. Après avoir éliminé le surnageant par pipetage, l'ADN a été rincé par ajout de 1 mL d'éthanol à 70 %. Enfin, la solution a été centrifugée une dernière fois pendant 2 min à 20 000 x *g* avant élimination du surnageant par pipetage et séchage de l'ADN. L'ADN a ensuite été resuspendu dans 100 µL de tampon Tris EDTA, avant ajout de 1 µL de RNAse à 10 mg/mL et incubation 15 min à 37 °C afin d'éliminer les ARN présents. L'ADN a finalement été congelé à -20°C avant amplification du fragment ITS2.

Une quantification des ADN double brin au Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) a été réalisée selon le protocole présenté dans le chapitre 2.

PCR pour amplification de la région ITS2

La région ITS2 d'ADN de levures (240 à 400 pb) a été amplifiée avec l'enzyme AccuPrime Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) et les primers ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' ; White *et al.*, 1990) et ITS4_KYO1 (5'-TCCTCCGCTTWTTGWTWTGC-3' ; Toju *et al.*, 2012). Les amorces ITS3 et ITS44_KYO1 comportaient respectivement les adaptateurs Illumina 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' et 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'. La PCR a été réalisée sur 10 ng d'ADN à l'aide du thermocycleur PTC-200 thermal cycler (Peltier, BioRad, Hercules, USA) selon le programme suivant : dénaturation (94 °C – 1 min), suivie de 30 cycles d'amplification comprenant dénaturation (94 °C – 1 min), hybridation des amorces (55 °C – 1 min) et élongation (72 °C – 60 s) et enfin d'une phase d'élongation à 72 °C pendant 10 min.

Purification des produits de PCR ITS2, estimation de leur quantité, préparation des librairies Illumina MiSeq, séquençage, contrôle qualité

Se référer à la section *Materials and Methods* du chapitre 2.

Clustering d'OTUs et traitement des données de séquençage

Parmi les séquences ITS2, nous avons sélectionné les séquences entre 190 et 450 pb et un clustering avec une distance maximale d'agrégation de trois nucléotides a été réalisé. Nous avons éliminé les OTUs avec une très faible abondance (< 0,005 %) correspondant à des artéfacts, en ne retenant que les OTUs avec au moins 25 lectures dans le jeu de données complet (soit 0,009 % des 507 000 séquences). Enfin, nous avons procédé à une dernière étape d'extraction des régions ITS1 et ITS2 hypervariables. A l'issue de ces étapes, 3 OTUs ont été obtenues.

4.3 RESULTATS

Mise en place d'un plan d'expériences

A la demande du partenaire industriel, nous avons testé une gamme de concentrations de sel plus large lors du passage à l'échelle pilote que lors de l'étude dans l'écosystème synthétique afin d'inclure la teneur en sel de 18 g/kg, concentration plus proche de la moyenne du marché pour le jambon supérieur cuit, située entre 1,8 et 1,9 g/kg (ANSES, 2017). Dans cette gamme de concentrations, les concentrations en sel et en nitrite ont été choisies selon un plan d'expériences composite centré, permettant la modélisation de surfaces de réponses (exemples de réponses : niveau de population, pH, production de métabolites). Pour cela, nous avons fait varier chacun des facteurs, concentration en nitrite (X1) et concentration en sel (X2), sur cinq niveaux différents (0 ; 10 ; 30 ; 50 ; 60 mg/kg pour le nitrite et 9 ; 11 ; 14 ; 17 ; 19 g/kg pour le sel). Deux points supplémentaires ont également été testés, correspondant à des jambons sans nitrite aux concentrations en sel extrêmes de 9 g/kg (point K) ou 19 g/kg (point J). Ces points visaient à voir si le paramètre concentration en sel pouvait être modulé pour compenser l'absence de nitrite.

Les essais ont été réalisés de manière séquentielle mais dans une même baratte pilote avec un barattage rapide dans le but de limiter le nombre de lots de viande utilisés (induisant potentiellement des biais microbiologiques non liés au sel et au nitrite). Cette durée de barattage, additionnée à des phases de nettoyage entre les différents points d'essais a limité le nombre d'essais à trois par semaine, soit une durée de quatre semaines pour réaliser la totalité des essais. Cette organisation de la production a nécessité l'utilisation de quatre lots différents de viande crue provenant du même abattoir. L'ordre des essais a été choisi de telle sorte que des concentrations en sel et en nitrite proches ne correspondent pas à un même lot (par exemple, nous avons évité que trois essais correspondant à une faible concentration en nitrite soient réalisés avec un même lot de viande). Ainsi, dans l'éventualité où les communautés microbiennes du jambon seraient différentes en fonction des lots de viande, il serait alors possible de le détecter et de distinguer cet effet lot de

l'effet du sel et du nitrite. Outre les contraintes au niveau du barattage, il nous a fallu minimiser le nombre de phases de tranchage à une par semaine. Pour cela, la durée des étapes intermédiaires de transport sous vide et de stockage après cuisson (préalablement identifiées dans le chapitre 2 comme des étapes affectant peu les communautés bactériennes du produit fini) a été ajustée. Pour chaque essai, une partie des jambons a été tranchée sur la ligne A et l'autre partie sur la ligne B dans le but d'observer l'effet du sel et du nitrite sur deux profils de communautés différents.

L'emballage le plus perméable à l'O_2 a été utilisé car nous avons montré dans le chapitre 2 qu'il induisait une augmentation de la croissance de *S. proteamaculans* sur les jambons issus de la ligne B. Cette augmentation s'accompagnant d'une production plus importante d'acide acétique, elle est susceptible d'induire un degré d'altération plus important, c'est pourquoi nous avons retenu l'emballage le plus perméable à l'O_2 pour cette expérimentation.

Un total de 56 échantillons par ligne de tranchage a été collecté (quatre réplicas pour chacun des points suivants : neuf points d'essais du plan d'expériences, trois points additionnels au centre du domaine et deux points d'essais supplémentaires J et K demandés par l'industriel partenaire).

La réponse des communautés bactériennes au sel et au nitrite est différente selon la ligne de tranchage dont les jambons sont issus

Après 28 jours de stockage, la diversité bactérienne est composée de 48 OTUs, correspondant à 21 espèces bactériennes. Ces espèces avaient déjà été détectées dans les campagnes d'échantillonnage précédentes, à l'exception de *Yersinia intermedia*, d'une espèce du genre *Rahnella* et d'une espèce du genre *Proteus*. Parmi ces espèces, les 14 espèces les plus abondantes représentent 99,8 % de l'abondance totale dans les échantillons du plan d'expériences (voir Figure 32). La comparaison de la diversité bactérienne entre les échantillons à 28 jours sur la base de l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis montre deux grands profils de communautés correspondant à ceux de jambons tranchés sur les deux lignes.

Dans cette étude, le point H (indiqué dans la Figure 30) représente l'échantillon de référence le plus proche des concentrations en sel et en nitrite testées dans le chapitre 2. Cet échantillon était dominé par *C. divergens* pour les jambons de la ligne A et par des bactéries du genre *Serratia* (*S. proteamaculans* et *S. liquefasciens*) pour les jambons de la ligne B. Comme indiqué dans la partie droite de la Figure 32, ces communautés sont proches de celles que nous avions observées dans les campagnes précédentes pour des échantillons produits dans les mêmes conditions (même ligne de tranchage et même emballage). Ainsi, même deux ans plus tard, l'empreinte microbiologique de la ligne reste similaire.

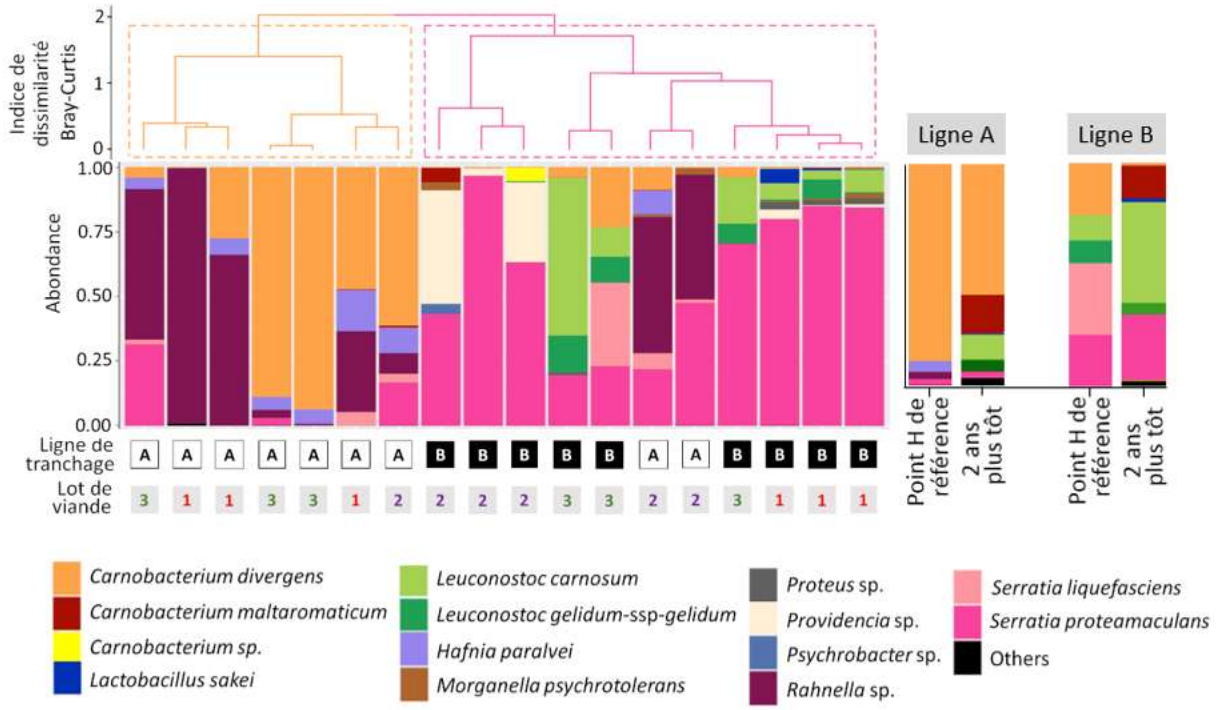


Figure 32 : Clustering Ward non supervisé des échantillons de jambons en fonction de leur indice de dissimilarité de Bray-Curtis et comparaison du point de référence avec les échantillons des campagnes précédentes.

Le clustering révèle deux groupes principaux en fonction de la ligne de tranchage. Un graphique indiquant la composition (abondance relative) des différents échantillons sur la base des données de séquençage se trouve sous l'arbre de clustering. A droite de la figure, la composition bactérienne du point de référence H (voir Figure 30) dans la présente étude est comparée à la composition moyenne obtenue sur les campagnes d'échantillonnage 2 ans auparavant (C1 à C4) pour des échantillons à 28 jours produits dans les mêmes conditions (même ligne et même emballage).

Nous avons remarqué un léger effet des lots de viande sur les échantillons de la ligne B. En effet, la Figure 32 indique que ces échantillons se regroupent en fonction des lots de viande, ce qui n'est pas le cas pour ceux de la ligne A. Les échantillons de la ligne A présentent deux grands profils de communautés (indiqués par deux sous-embranchements sur la Figure 32), l'un dominé par *C. divergens*, l'autre par *Rahnella* sp. La Figure 33 révèle que ces deux grands profils sont clairement corrélés aux concentrations en sel et en nitrite utilisées. A faible concentration en sel et en nitrite, les échantillons sont dominés par *Rahnella* sp. tandis qu'aux concentrations les plus élevées, les échantillons sont dominés par *C. divergens* (et dans une moindre mesure par *Hafnia paralvei*). En revanche, pour les échantillons de la ligne B globalement dominés par *S. proteamaculans*, l'abondance relative des espèces n'est pas influencée par les concentrations en sel et en nitrite, à l'exception de l'échantillon sans nitrite, dominé par des bactéries du genre *Leuconostoc* (*L. carnosum* et *L. gelidum* subsp. *gelidum*).

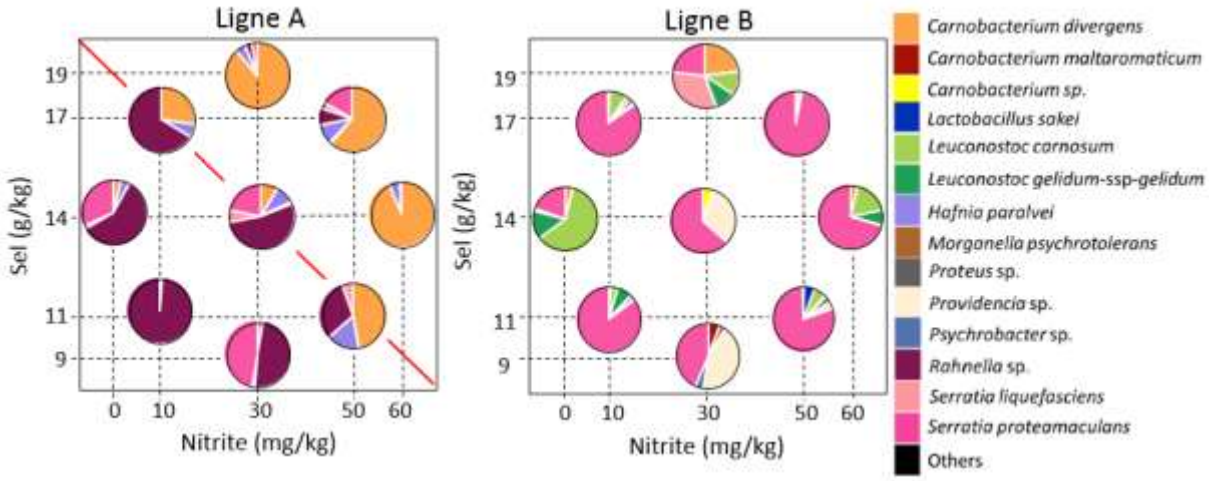


Figure 33 : Abondance relative des espèces dans les échantillons issus des lignes de tranchage A et B à différentes concentrations en sel et en nitrite.

Sur les échantillons de la ligne A, un trait rouge souligne la zone de codominance de Rahnella sp. et Carnobacterium divergens.

Comme observé dans la Figure 34, au sein de la communauté sur les échantillons de la ligne A, l'effet d'une réduction de sel et de nitrite sur les niveaux de population de *C. divergens* et de *H. paralvei*

n'est pas linéaire. En dessous du seuil de 12 g/kg de sel et en dessous du seuil de 25-30 mg/kg de nitrite, les niveaux de populations de *C. divergens* et de *H. paralvei* sont significativement inférieurs à ceux observés aux concentrations élevées en sel et en nitrite. Nous avons constaté qu'aux teneurs en nitrite supérieures à 50 mg/kg, où les niveaux de population de *C. divergens* et *H. paralvei* sont élevés, le niveau de population de *Rahnella* sp. est plus faible. Pour les échantillons de la ligne B, les niveaux de population ne sont pas significativement affectés par les concentrations en sel et en nitrite, à l'exception de *S. liquefasciens* et *C. maltaromaticum*.

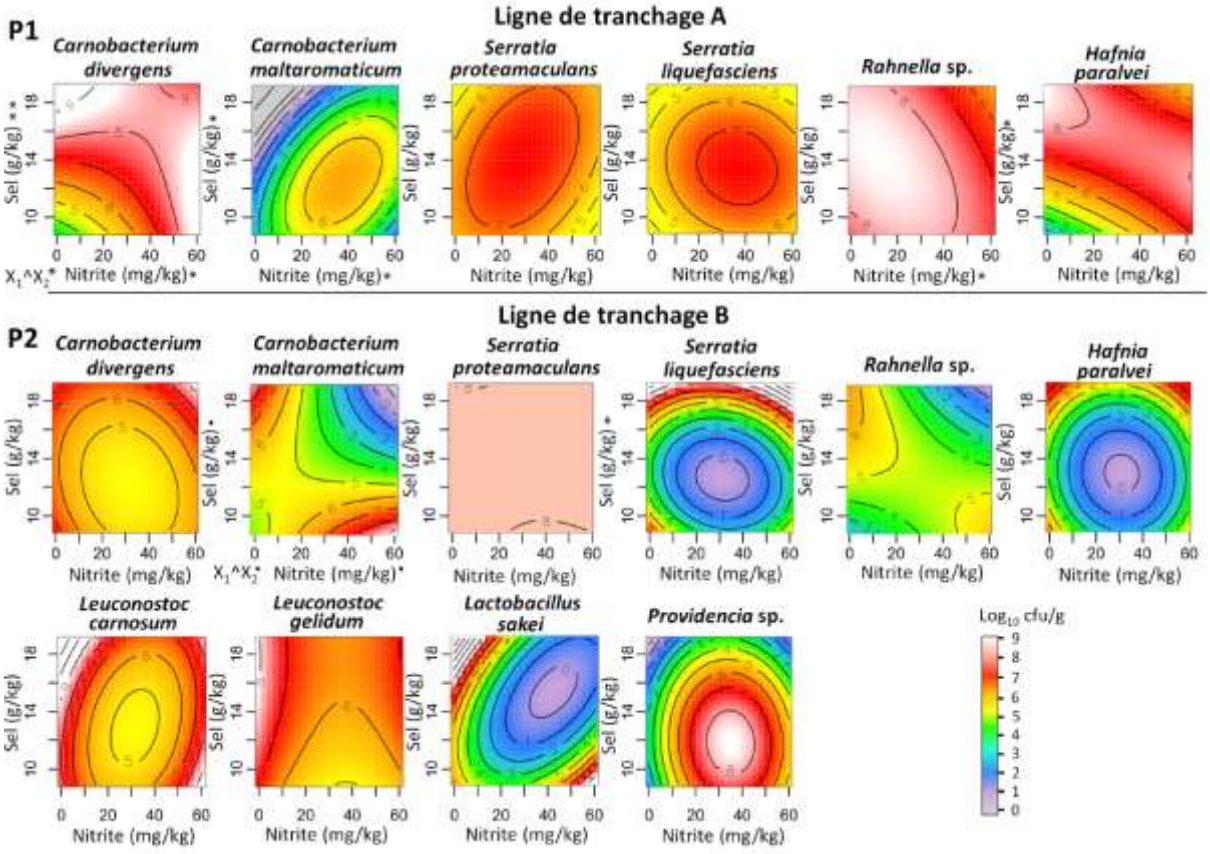


Figure 34 : Modélisation des niveaux de population au sein des communautés bactériennes des échantillons de la ligne A et de la ligne B en fonction des concentrations en sel et en nitrite.

*Les lignes de niveau correspondent aux niveaux de population absolus des différentes espèces au sein des échantillons de la ligne A (Panel P1) et au sein des échantillons de la ligne B (Panel P2). Ces niveaux ont été calculés en connaissant le niveau de population bactérienne total dans l'échantillon (données de dénombrements) et l'abondance relative des différentes espèces (données de séquençage). Les espèces parmi les 14 les plus abondantes sont représentées. La significativité de l'effet des facteurs sel et nitrite a été calculée avec une ANOVA : *** p-value < 0,001 ; ** p-value < 0,01 ; * p-value < 0,05 ; ● p-value < 0,1. La significativité de l'interaction entre deux facteurs est indiquée par le symbole X_1^X_2.*

Une réduction des concentrations en sel et en nitrite dans les jambons n'affecte pas la charge bactérienne totale et favorise la croissance de levures

Comme observé dans la Figure 35, la charge bactérienne totale n'est pas impactée par les différentes concentrations en sel et en nitrite. Aux concentrations classiquement utilisées pour la production de jambons en industrie (à 14 ou 18 g/kg de sel et 60 mg/kg de nitrite) nous avons observé que la croissance des levures était nulle (voir Figure 35). En revanche, à des teneurs en sel et en nitrite inférieures à ces teneurs de référence la présence de levures a été observée à des niveaux de population généralement compris entre 1 et 5 $\log_{10}$ ufc/g.

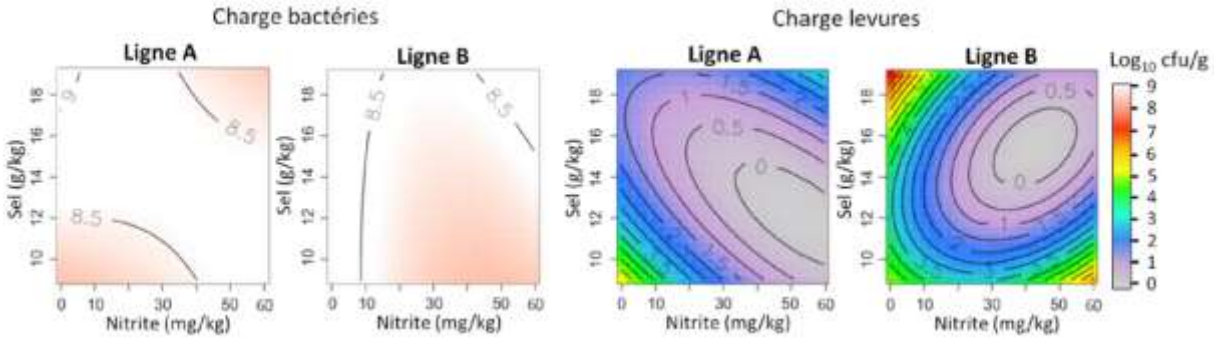
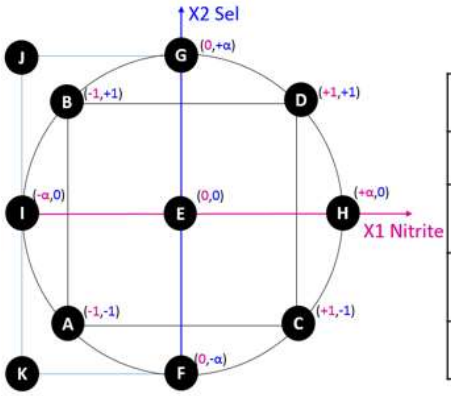


Figure 35 : Modélisation de la croissance des bactéries et levures cultivables dans les échantillons issus des deux lignes de tranchage.

Candida sake et *Yarrowia bubula* ont été identifiées sur les jambons de la ligne A (voir Table 9), et leur croissance est plutôt favorisée à de faibles concentrations en sel uniquement. *C. argentea* a été identifiée sur les jambons de la ligne B et sa croissance est favorisée à de faibles concentrations en sel ou à de faibles concentrations en nitrite. Cette même espèce de levure avait déjà été détectée dans les jambons de la ligne B sur des jambons de type standard à DLC+50% (voir chapitre 2). La croissance des levures sur des jambons à de faibles concentrations en sel et en nitrite à 28 jours de stockage est un paramètre important à prendre en compte car il peut influencer les équilibres

microbiens et la production de métabolites d'altération. Nous n'avions pas anticipé ce paramètre dans le modèle établi précédemment dans le chapitre 3.

Table 9 : Pourcentage des différentes espèces de levures dans les échantillons présentant au moins 2 log_{10} ufc/g. (Les lettres indiquent les différents points d'essai correspondants)



	Ligne A		Ligne B					
Point d'essai	A	B	A	B	C	I	J	K
Candida argentea			100%	100%	100%	100%	100%	100%
Yarrowia bubula		100%						
Candida sake	100%							

Des défauts d'altération apparaissent principalement dans les échantillons avec de faibles concentrations en nitrite, indépendamment des concentrations en sel.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu voir si les modifications de la structure des communautés bactériennes et l'apparition de levures à faibles concentrations en sel et en nitrite étaient corrélées à des changements de qualité organoleptique des jambons. Pour cela, nous nous sommes basés sur des indicateurs d'altération tels que le pH, la couleur et la formation de colonies à la surface du jambon, ou encore la concentration en métabolites (éthanol, acide acétique et acide lactique).

A 28 jours de stockage, les échantillons avaient généralement un pH inférieur au pH initial (T_0). Une acidification maximale de 0,5 unités pH a été observée sur les échantillons de la ligne B aux faibles concentrations en nitrite (voir Figure 36). Cette acidification coïncide avec une forte production d'acide D-lactique, d'acide acétique et d'éthanol de l'ordre de 0,5 mg/kg, 0,20 mg/kg et 0,20 mg/kg respectivement. Pour les jambons de la ligne A, nous avons constaté qu'à faibles concentrations de

sel et de nitrite, certains échantillons à 28 jours avaient un pH légèrement supérieur au pH initial. Pour comprendre les raisons de cette augmentation de pH, inattendue à faible concentration en sel et en nitrite, nous nous sommes intéressés à la production de produits de fermentation à ces concentrations. Sur tous les échantillons de la ligne A, la production d'acide D-lactique, acétique et formique était faible (de l'ordre de 0 à 0,1 mg/kg). Nous avons noté qu'aux faibles concentrations en sel, la concentration d'acide L-lactique diminuait fortement entre T_0 et 28 jours (de l'ordre de 1,5 mg/kg), tandis qu'aux fortes concentrations en sel, cette concentration n'était pas modifiée. Cela peut expliquer partiellement l'augmentation de pH précédemment observée sur la ligne A. Cette diminution de l'acide L-lactique au cours du temps à de faibles concentrations en sel a également été constatée pour les échantillons de la ligne B, mais dans une moindre mesure.

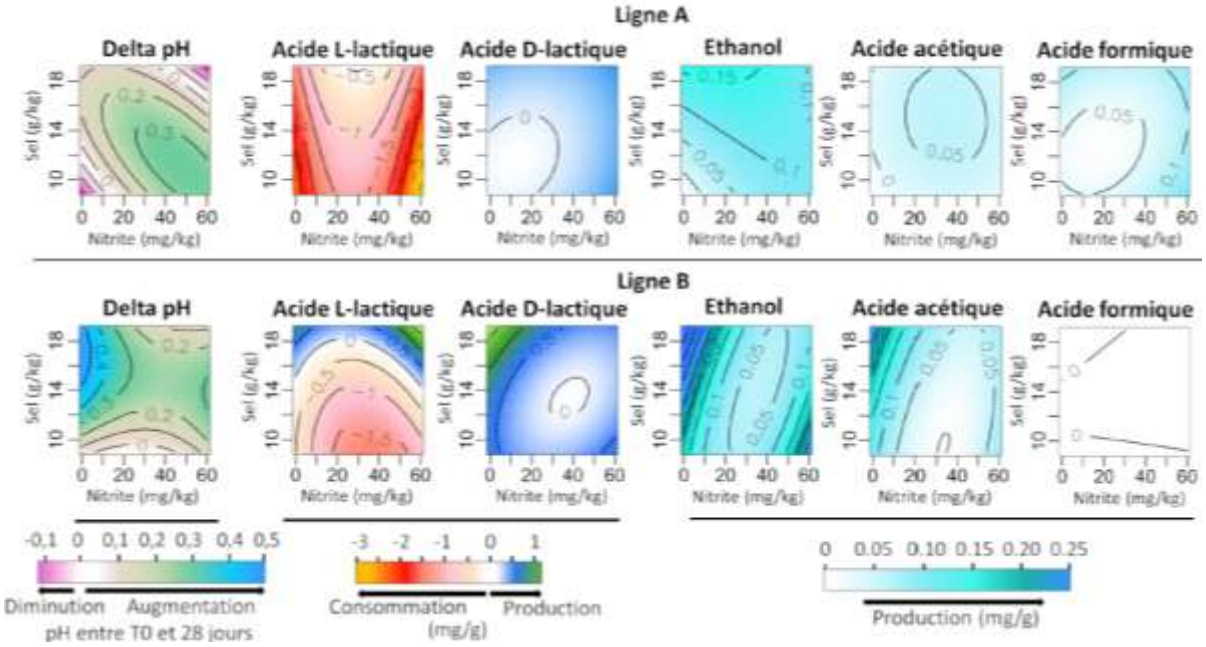


Figure 36 : Modélisation des écarts de pH entre T0 et DLC et de la production de métabolites issus de la fermentation du pyruvate dans les échantillons en fonction des concentrations en sel et en nitrite.

La partie haute de la figure correspond aux modélisations du delta pH et de la production de métabolites sur les échantillons de la ligne A et la partie basse correspond à celles sur les échantillons de la ligne B. Différentes légendes sont indiquées en bas du graphique et s'appliquent aux graphiques des deux lignes.

D'autres signes d'altération ont été détectés dans les échantillons à 28 jours. Neuf des 22 échantillons présentaient des colonies. Par des mesures chromamétriques, nous avons détecté que

neuf échantillons présentaient des défauts de couleur (tons bruns) par rapport à la couleur rose attendue du jambon à 60 mg/kg de nitrite. Dans la Figure 37, nous avons cherché à voir si les concentrations en sel et en nitrite avaient un effet sur l'altération. Pour cela, les échantillons ont été regroupés en fonction de critères d'altération et il ressort clairement que ces défauts apparaissent principalement à de faibles concentrations en nitrite. Les échantillons à 0 et 10 mg/kg de nitrite présentaient une altération liée à un brunissement et à l'apparition de colonies, tandis qu'au-delà de 30 mg/kg de nitrite les échantillons n'étaient pas altérés. Pour les indicateurs d'altération choisis, les concentrations en sel n'avaient pas d'effet sur l'altération.

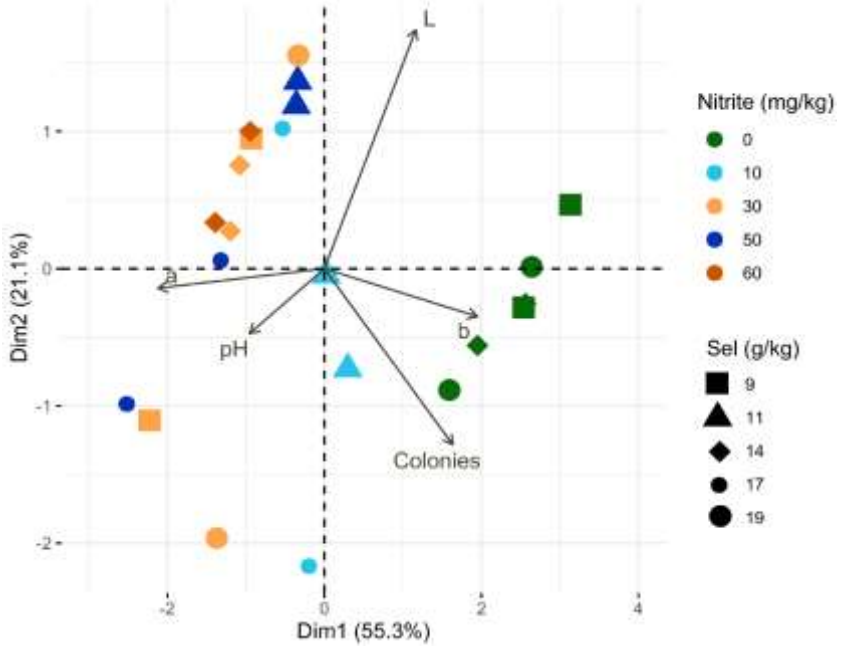


Figure 37 : Analyse en Composante Principale des échantillons aux différentes concentrations en sel et en nitrite sur la base d'indicateurs d'altération.

Finalement, ces résultats montrent que la structure des communautés bactériennes peut dépendre à la fois des concentrations en sel et en nitrite, tandis que l'apparition de défauts d'altération dépend majoritairement de la concentration en nitrite.

4.4 DISCUSSION

Dans cette étude, nous avions pour objectif de mesurer l'impact d'une réduction de sel et de nitrite sur la structure des communautés microbiennes de jambons issus de deux lignes de tranchage différentes et sur le développement de l'altération de jambons.

La réponse des communautés microbiennes de jambons est fonction de la ligne de tranchage

Un des résultats marquants est que la réponse des communautés bactériennes au sel et au nitrite est très différente selon la ligne sur laquelle les jambons ont été tranchés. Deux ans auparavant, nous avions déjà remarqué cet effet ligne marqué sur la structure des communautés bactériennes et sur la production de métabolites d'altération (voir chapitre 2). Nous avons retrouvé ce même effet ligne sur le point de référence dans cette étude (en conditions standards de sel et de nitrite), ce qui confirme la stabilité de l'empreinte microbiologique d'une ligne donnée, même à deux ans d'intervalle.

Nous avons remarqué que pour les jambons de la ligne B, les communautés bactériennes n'étaient que peu influencées par les concentrations en sel et en nitrite. A l'exception de l'échantillon sans nitrite, qui présentait une prévalence de *Leuconostoc*, les échantillons de cette ligne étaient dominés par *S. proteamaculans*, présente à une charge bactérienne de 8 $\log_{10}$ ufc/g. Il peut être noté que dans l'écosystème synthétique (voir chapitre 3), *S. proteamaculans* était classée parmi les espèces peu impactées par les concentrations en sel et en nitrite (voir Figure 27) et les *Leuconostoc* parmi les espèces dont la croissance était favorisée aux faibles concentrations en sel et en nitrite. De plus, dans la présente étude, pour les échantillons de la ligne B, la structure des communautés variait légèrement en fonction des lots de viande (prévalence de *Providencia* sp. dans le lot 1 ou de *L. carnosum* et *L. gelidum* dans le lot 3). Il est possible que cet effet lot ait limité la capacité de notre modèle à capter l'effet réel du sel et du nitrite. Cette observation souligne l'intérêt de travailler sur des écosystèmes modèles plus contrôlés pour s'affranchir de cet effet lié au procédé.

En revanche, l'abondance relative des espèces des jambons de la ligne A (en particulier *C. divergens, Rahnella* sp. et *H. paralvei*) était significativement différente en fonction des teneurs en sel et en nitrite. La diminution progressive de l'abondance relative de *Rahnella* sp. (visible sur la Figure 33) au profit de *C. divergens* et *H. paralvei* au fur et à mesure que les concentrations en sel et en nitrite augmentent peut avoir plusieurs interprétations : soit la croissance de *Rahnella* sp. est inhibée aux teneurs en sel et en nitrite élevées, soit *C. divergens* et *H. paralvei* ont une croissance préférentielle à ces teneurs. Nous pensons que la première interprétation est la plus probable. En effet, si l'on observe le comportement de ces trois espèces au sein des communautés de la ligne B, lorsque *Rahnella* sp. est sous-dominante, la croissance de *C. divergens* n'est que peu affectée par les concentrations en sel et en nitrite. De plus, la diminution progressive de l'abondance relative de *Rahnella* sp. sur les échantillons de la ligne B, (tout comme sur ceux de la ligne A) au fur et à mesure que la concentration en sel et en nitrite augmente est un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse.

Nous avons remarqué une forte interaction des facteurs sur les niveaux de population de *C. divergens* et *H. paralvei* dans les communautés des échantillons de la ligne A. Une concentration en dessous du seuil de 12 g/kg de sel et de 25-30 mg/kg de nitrite s'accompagne d'une diminution du niveau de population de *C. divergens* de 4 $\log_{10}$ ufc/g. A ces faibles concentrations, nous avons observé un déséquilibre des espèces (dominance de *Rahnella* sp.), alors qu'une concentration en sel et en nitrite supérieure à ces teneurs permet de maintenir un équilibre des espèces et en particulier, un niveau de population de *C. divergens* élevé. Or, nous avons vu dans le chapitre 2 que les échantillons dominés par *C. divergens* présentaient une faible production de métabolites d'altération comparativement aux autres échantillons. Par ailleurs, les bactéries du genre *Rahnella* sont connues comme des bactéries occasionnellement présentes dans les produits carnés et pouvant être associées à l'altération de la viande de porc (Godziszewska *et al.*, 2017). Il peut d'ailleurs être noté que le genre *Rahnella* est phylogénétiquement proche du genre *Serratia*, qui était également

dominant à de faibles concentrations en sel et en nitrite dans les échantillons issus de la ligne B. Cette apparition de *Rahnella* sp., qui n'avait pas été détectée jusqu'alors, y compris dans la viande crue, pose la question de sa fréquence d'apparition dans les échantillons : est-elle toujours présente mais inhibée par l'ajout de sel et de nitrite ou est-elle ponctuellement présente dans certains lots de viande ou dans l'environnement de production ? Le fait que *Rahnella* sp. soit détectée, bien qu'en faible proportion dans les échantillons issus de la ligne A à des teneurs en sel et nitrite élevées est un argument en faveur de la seconde hypothèse.

Les deux points d'essais supplémentaires à des concentrations extrêmes en sel nous ont permis de voir qu'en l'absence de nitrite, une concentration en sel élevée maintenait un niveau élevé de *C. divergens* et un niveau faible de *Rahnella* sp. Il faut noter que l'écosystème de jambon synthétique (chapitre 2) nous prédisait un déséquilibre des abondances d'espèces et une production plus importante de métabolites d'altération au même seuil de concentrations que dans la présente étude (12 g/kg de sel et de 25-30 mg/kg de nitrite).

Par ailleurs, nous avons montré qu'une réduction des concentrations en sel et en nitrite n'affectait pas uniquement la croissance des bactéries, mais augmentait également celle des levures. Ce résultat est assez surprenant car des études ont montré que la croissance des levures dans différents produits carnés (comme le jambon, mais aussi les saucisses, le bacon, le salami et le boudin) était au contraire favorisée aux concentrations en sel les plus élevées (Aaslyng *et al.*, 2014 ; Laranjo *et al.*, 2017). De même, Perea-Sanz (2018) a montré que la croissance de levures était plus importante dans des saucissons à fortes teneurs en nitrate. Cependant, ces études n'ont pas été jusqu'à l'identification taxonomique de ces levures et ne proposent pas de nom d'espèce. Les espèces de levures que nous avons identifiées dans cette étude (*Y. bubula*, *C. sakei* et *C. argentea*) ont été citées dans la littérature comme isolées dans des produits non salés et non nitrités. *Y. bubula* a été isolée sur de la viande de porc, de bœuf et de dinde (Nagy *et al.*, 2014) et *C. argentea* est très peu décrite et a été isolée de viandes crues sous vide (Erl-Höning, 2014). En revanche, *C. sake* a été récemment

identifiée dans des jambons stockés sous atmosphère modifiée et semble donc tolérer des concentrations en sel et en nitrite élevées (Nielsen *et al.*, 2008b ; Raimondi *et al.*, 2019).

Au regard des indicateurs d'altération choisis, les jambons les plus altérés sont ceux avec des concentrations en nitrite inférieures à 30 mg/kg

Malgré une concentration près de 50 fois plus faible du nitrite par rapport au sel, nous avons observé un effet très important du nitrite, non seulement sur la structure de communautés bactériennes, mais aussi sur l'altération des jambons. Il est intéressant de noter que de très faibles variations de la concentration en nitrite suffisent à passer d'un état altéré à un état non altéré (par exemple, les échantillons à 0 % de nitrite étaient généralement altérés, tandis que ceux à 30 mg/kg de nitrite ne l'étaient pas). Nous avons observé un effet seuil à 30 mg/kg de nitrite, en dessous duquel les échantillons présentaient des signes d'altération de type brunissement ou formation de colonies.

Le rôle du nitrite dans la couleur rose est connu, il n'est donc pas étonnant qu'un brunissement soit observé sur les échantillons sans nitrite. Nous avons constaté une couleur rosée à partir de 10 mg/kg et une couleur rose définitive à partir de 30 mg/kg, soit une concentration légèrement inférieure à celle observée par Eakes et Blumer (1975) et Froehlich (1983) entre 40 et 50 mg/kg de nitrite. Par ailleurs, nous avons observé la formation de colonies à la surface des échantillons aux faibles concentrations en nitrite. En prenant en compte uniquement les échantillons du plan factoriel, la charge bactérienne ne semblait pas impactée par le nitrite (voir Figure 35) et restait proche de 8,5 $\log_{10}$ ufc/g. Cependant, ce plan factoriel ne contenait qu'un seul point sans nitrite (le point I) pour chaque ligne de tranchage. La mesure de la charge bactérienne sur quatre barattes supplémentaires (J et K sur la ligne A et B) nous a permis de voir que la charge bactérienne était en fait légèrement supérieure dans les échantillons sans nitrite par rapport aux autres échantillons (charge de 9 $\log_{10}$ ufc/g en moyenne ; données non affichées). Cette augmentation est une explication possible à l'apparition de colonies bactériennes majoritairement dans ces échantillons.

Un dernier paramètre d'altération que nous avons pris en compte est le pH. Une forte diminution de pH (de l'ordre de 0,5 unités pH) a été constatée dans les échantillons de la ligne B, principalement entre 0 et 10 mg/kg de nitrite. Ainsi, une réduction de nitrite augmente la production de métabolites issus de la fermentation du pyruvate tels que l'éthanol, l'acide D-lactique et l'acide acétique. Il peut être souligné que c'est à ces faibles concentrations en nitrite que *L. carnosum* et *L. gelidum*, bactéries au métabolisme hétérofermentaire, connues pour produire ces composés (Cogan et Jordan, 1994 ; Dols *et al.*, 1997), étaient les plus abondantes. En revanche, sur les échantillons de la ligne A, nous avons remarqué une légère augmentation du pH à de faibles concentrations en sel et en nitrite. Cette augmentation de pH aux faibles concentrations en sel et en nitrite était corrélée à une diminution de l'acide L-lactique. Cette diminution peut s'expliquer soit par une consommation de l'acide L-lactique par les micro-organismes, soit par une réaction de l'acide L-lactique avec d'autres composés. Les échantillons de la ligne A où une augmentation de pH a été constatée à faible concentration en sel et en nitrite, présentaient des levures et étaient dominés par *Rahnella* sp. Une explication possible à ces résultats pourrait être une consommation de l'acide L-lactique par *Rahnella* sp. et/ou par les espèces de levures détectées (Mansour *et al.*, 2008). De façon similaire, Signorini (2003) a observé une augmentation de pH au cours du temps dans la viande de bœuf. Cette augmentation était corrélée à une activité protéolytique importante caractérisée par la production d'ammoniac. Les bactéries appartenant à l'ordre des *Enterobacteriales* telles que *Rahnella* sp. sont connues pour leurs activités protéolytiques (Octavia et Lan, 2014). Il serait donc intéressant de quantifier la production d'ammoniac résultant de la déamination des protéines, qui pourrait également être une explication à l'augmentation de pH observée.

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre ont montré une fois encore que la ligne de tranchage est un facteur prégnant : elle conduit non seulement à différentes communautés microbiennes (bactériennes et levuriennes) mais conditionne la réponse de ces communautés à une réduction de sel et de nitrite et ainsi le profil d'altération des jambons.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

5 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'altération des aliments résulte de l'interaction des communautés microbiennes avec leur environnement : ces dernières utilisent les substrats présents pour produire l'énergie nécessaire à leur croissance et les dégradent en produits de fermentation, dont l'accumulation peut conduire à l'altération. Dans le cas du jambon, le sel et le nitrite ajoutés à la matière première limitent le développement de l'altération. Une réduction de ces composés constitue un changement environnemental susceptible de modifier les équilibres microbiens existants et ainsi d'impacter le développement de l'altération et la durée de vie du produit.

Dans cette thèse, nous avons cherché à déterminer les conséquences d'un tel changement environnemental sur l'écologie microbienne du jambon cuit. Pour cela, nous avions pour objectif de connaître l'écologie microbienne de jambons issus d'une usine de production aux teneurs standards en sel et en nitrite utilisées en industrie et de déterminer l'impact d'une réduction de sel et de nitrite par rapport à ces conditions standards sur l'écologie microbienne de ces produits.

La ligne de tranchage est le facteur majeur façonnant l'écologie microbienne des jambons de l'usine étudiée

Au regard de la littérature, nous savions que les communautés bactériennes dans le jambon pouvaient varier en fonction de la matière première, des ingrédients et additifs utilisés, des différentes étapes de production, de la durée et des conditions de stockage ou encore des saisons. Afin de déterminer les paramètres façonnant les communautés microbiennes dans l'usine de production étudiée, notre stratégie a été de choisir un vaste plan de prélèvements, prenant en compte à la fois la variabilité dans le temps (campagnes d'échantillonnage sur six mois) et les paramètres de production et de stockage. Parmi les cinq paramètres de production que nous avions identifiés au départ comme susceptibles d'impacter les communautés microbiennes du jambon (type

de conditionnement pour le transport de la viande crue jusqu'à l'usine de production, vitesse du barattage, durée de stockage après cuisson, ligne de tranchage et perméabilité de l'emballage), la ligne de tranchage s'est révélée être le facteur majeur de variabilité. Il était déjà connu que l'équipement de tranchage pouvait être source de contamination bactérienne (Pothakos *et al.*, 2015c; Vasilopoulos *et al.*, 2008). Cependant, en optant pour une large stratégie d'échantillonnage échelonnée sur six mois (quatre campagnes), notre travail a permis d'apporter des précisions supplémentaires sur la nature de ces contaminations et leur persistance dans le temps. Ainsi, nous avons montré pour la première fois qu'une ligne de tranchage donnée avait sa propre empreinte microbiologique et que cette empreinte était stable dans le temps, même à deux ans d'écart.

Cependant, l'origine de la différence observée entre les deux lignes reste à identifier. Cette différence est-elle due à la sélection de certaines bactéries au moment du tranchage ou à une contamination par des bactéries présentes sur la ligne de tranchage? S'il s'agit d'une contamination par la ligne de tranchage, s'agit-il d'un biofilm ou encore d'un réservoir de bactéries/levures inaccessibles au nettoyage? Une analyse d'écologie microbienne de la ligne de tranchage, comparant les communautés bactériennes d'échantillons prélevés à différentes zones de la chaîne de tranchage (par exemple avant démoulage, après démoulage et avant tranchage, après tranchage, après emballage) pourrait apporter des éléments de réponse.

Par ailleurs, les deux lignes que nous avons étudiées correspondaient chacune à une technologie de tranchage différente. Dans l'usine de production étudiée, d'autres lignes de tranchage correspondant à l'une ou l'autre de ces technologies sont également utilisées. Les empreintes microbiologiques des lignes de tranchage sont-elles les mêmes pour une technologie de tranchage donnée ? Pour répondre à cette question, nous pourrions comparer les empreintes microbiennes de plusieurs lignes correspondant à une même technologie de tranchage. Cette information permettrait d'établir rapidement une cartographie des grands profils de communautés pouvant être rencontrés dans l'usine de production.

Trois des quatre autres paramètres du procédé de production que nous avions initialement choisis se sont également avérés influents dans une moindre mesure, et ont permis de comprendre les différences plus fines (concernant une espèce donnée) observées au sein des deux grands profils de communautés liés au tranchage. Par exemple, nous avons mis en évidence la prévalence de *S. proteamaculans* avec un transport à l'air libre de la viande crue et avec l'emballage le plus perméable à l'O_2 sur les échantillons de la ligne B.

Initialement, nous ne savions pas dans quelle mesure les campagnes d'échantillonnage (lots de viande) pouvaient impacter les communautés microbiennes du jambon. A l'issue de ce travail, nous savons désormais que, bien qu'il s'agisse d'un produit cuit, ce paramètre est la deuxième source de variabilité des communautés bactériennes du produit fini après la ligne de tranchage. Le fait que nous ayons mis en évidence que les espèces présentes dans le jambon à DLC étaient également présentes dans la viande crue est un argument supplémentaire en faveur de cette interprétation. S'agit-il des mêmes souches avant et après cuisson? Les souches présentes à DLC ont-elles des particularités métaboliques (impliquées par exemple dans l'altération, la résistance à la cuisson ou encore l'accrochage aux surfaces) ?

Parmi les autres paramètres que nous avons testés, nous avions supposé qu'une prolongation du temps de stockage après DLC pouvait affecter la structure des communautés, car c'est généralement après cette date que des défauts d'altération apparaissent. Or, nous avons montré que la structure des communautés bactériennes était stable dès DLC et n'évoluait pas entre DLC et DLC+50%. Nous avons fait le choix de nous placer à DLC pour chercher des corrélations entre les profils de communautés et les profils de production de métabolites d'altération car il s'agit d'un temps de prélèvement charnière où nous avions remarqué que certains jambons commençaient à s'acidifier, montrant ainsi le reflet direct d'une activité métabolique liée à la production d'acides. Nous savions également qu'il était complexe d'établir des corrélations entre la présence de groupes bactériens et la production de composés d'altération dans le jambon (Raimondi *et al.*, 2019) du fait de la variabilité

des communautés bactériennes. Un large échantillonnage, une identification des taxons à l'échelle de l'espèce ou intra-espèce ainsi qu'un dosage ciblé des métabolites d'altération principaux nous ont permis d'établir ces corrélations et ainsi d'identifier, sur la base de leurs communautés bactériennes des échantillons susceptibles de s'altérer plus rapidement. Il s'agit, par exemple, d'échantillons dominés par *L. carnosum*, *L. gelidum*, *L. mesenteroides*, *S. proteamaculans* ou encore par *C. maltaromaticum* présentant une production plus importante de métabolites d'altération issus de la fermentation du pyruvate. Cette information pose la question de la validité des DLC génériques. Est-il possible d'établir une DLC sur la base de marqueurs taxonomiques ? Si oui, la détermination d'une DLC spécifique pour les échantillons présentant un même profil de communauté bactérienne (issus d'une ligne donnée) pourrait être envisagée. Faut-il également prendre en compte des marqueurs fonctionnels ?

Une réduction de sel et de nitrite n'a pas un impact générique sur les communautés

Au regard de la littérature, nous n'avions que peu de connaissances sur l'impact d'une réduction simultanée de sel et de nitrite sur l'écologie microbienne du produit et nous ne savions pas dans quelle mesure cette réduction allait impacter la structure des communautés microbiennes du produit et la production de métabolites d'altération.

Ce travail de thèse a permis de montrer qu'une telle réduction n'a pas un impact générique sur les communautés, et qu'il faut étudier la réponse de chaque communauté au cas par cas. En effet, les deux profils de communautés étudiés en condition de production avaient des réponses très différentes selon la ligne de tranchage. Ainsi, si nous voulons pouvoir estimer l'impact d'une réduction de sel dans toutes les conditions de productions, il faut avoir une connaissance précise de l'écologie microbienne de toutes les lignes de tranchage (nécessité de la cartographie proposée ci-dessus).

Globalement, sur les trois profils de communautés dont nous avons étudié la réponse à une réduction de sel et de nitrite (communauté synthétique, communauté des jambons de la ligne A et

communauté des jambons de la ligne B), deux des profils présentaient un fort déséquilibre d'espèces pour des concentrations en sel inférieures à 12 g/kg et pour des concentrations en nitrite inférieures à 25-30 mg/kg de nitrite. Ce déséquilibre s'accompagnait dans la communauté synthétique d'une production plus importante de métabolites d'altération. Nous avons ainsi mis en évidence un fort effet de synergie des facteurs sel et nitrite en dessous de ce seuil critique, et préconisons de ne pas abaisser simultanément les concentrations en dessous de ce seuil.

Au regard de cette étude des communautés bactériennes et de leur implication dans l'altération, il est possible de compenser une suppression de nitrite par une concentration en sel plus élevée pour limiter l'altération, mais cette alternative n'est pas forcément préférable pour la santé.

Est-il possible de mettre en place d'autres technologies de barrière pour compenser le retrait des barrières « sel » et « nitrite » ? Il peut être rappelé ici que l'emballage le plus perméable à l'O_2 a été utilisé pour la production de jambons à teneurs en sel et en nitrite réduites. Or, nous avons montré dans le chapitre 2 qu'à des teneurs standards, avec la technologie de barrière « emballage le moins perméable à l'O_2 », l'abondance relative de *S. proteamaculans* et la production d'acide acétique étaient plus faibles qu'avec l'emballage le plus perméable à l'O_2. Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que les technologies de barrière utilisées n'ont pas le même effet selon la communauté initiale. Il ouvre ainsi des pistes pour adapter les technologies de barrière en fonction de cette communauté microbienne. Par exemple à des teneurs en sel et en nitrite standards, il pourrait être envisagé de préférer l'emballage le plus perméable à l'O_2 uniquement sur une ligne où cela n'aurait pas de conséquences sur la production de métabolites d'altération (sur la ligne de tranchage A où il y a moins de *Serratia proteamaculans*). A des teneurs en sel et en nitrite réduites, nous avons constaté la croissance de *Rahnella* sp. sur une ligne de tranchage donnée et de levures sur les deux lignes de tranchage. Or, la croissance des levures et des bactéries du genre *Rahnella* est favorisée en présence d'O_2 (Ercolini *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 1990). De la même façon

que pour *Serratia proteamaculans*, l'emballage le moins perméable à l'O_2 pourrait être envisagé comme un levier pour limiter leur croissance.

Une réduction de sel et de nitrite favorise la croissance de levures

Nous savions d'après la littérature que la charge de levures pouvait être plus importante à de fortes teneurs en sel et en nitrate, mais ces études n'ont pas été jusqu'à l'identification taxonomique de ces levures. Ce travail de thèse a mis en évidence qu'une réduction de sel et de nitrite augmentait la croissance des levures *Y. bubula, C. sake* et *C. argentea*. Or, *Y. bubula* et *C. sake* ont été isolées de viandes altérées selon la littérature (Nagy *et al.*, 2014; Raimondi *et al.*, 2019). Ces levures contribuent-elles à l'altération des jambons ? Nous pourrions quantifier les métabolites d'altération dans les échantillons et rechercher des corrélations entre la production de métabolites d'altération et la présence de levures. Cependant, dans le cas où la croissance de levures s'accompagne de la croissance d'autres micro-organismes, il ne sera pas possible de discriminer « qui fait quoi » sur la base de la structure des communautés uniquement. Une approche de transcriptomique pourrait permettre de quantifier chez les différentes espèces les niveaux d'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la production des métabolites d'altération détectés dans les échantillons.

Et pour conclure,

En résumé, nos travaux montrent que dans des conditions standards en sel et en nitrite, les jambons sont principalement dominés par des bactéries lactiques variables en fonction des conditions de production et que le métabolisme est principalement fermentaire. En revanche, à des concentrations en sel et en nitrite réduites, de nouvelles espèces d'*Enterobacteriaceae* (telles que *Rahnella* sp., *Providencia* sp. ou *H. paralvei*) et de levures peuvent se développer. Pour étudier les écosystèmes et leurs interactions, il y a un intérêt à travailler sur des écosystèmes modèles pour s'affranchir de la variabilité microbienne induite par le procédé, mais une validation en conditions de production est nécessaire.

Finalement, ce travail montre que la connaissance de l'écologie microbienne du procédé de production est indispensable pour comprendre et maîtriser les changements de comportements microbiens face à une réduction de sel et de nitrite.

Références

Aaslyng, M.D., Vestergaard, C., Koch, A.G., 2014. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. Meat Sci. 96, 47–55. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.004

ADEME, 2016. Pertes et gaspillages alimentaires : l'état des lieux et leur gestion par étapes de la chaîne alimentaire. https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/pertes-et-gaspillages-alimentaires-201605-rapport.pdf

Ahmed, V., Verma, M.K., Gupta, S., Mandhan, V., Chauhan, N.S., 2018. Metagenomic profiling of soil microbes to mine salt stress tolerance genes. Front. Microbiol. 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00159

Alfaro, B., Hernández, I., Le Marc, Y., Pin, C., 2013. Modelling the effect of the temperature and carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria in packed fish products. Food Control. 29, 429–437. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.046

Almeida, A., Mitchell, A.L., Boland, M., Forster, S.C., Gloor, G.B., Tarkowska, A., Lawley, T.D., Finn, R.D., 2019. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. Nature 568, 499–504. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1

Almeida, M., Hébert, A., Abraham, A.-L., Rasmussen, S., Monnet, C., Pons, N., Delbès, C., Loux, V., Batto, J.-M., Leonard, P., Kennedy, S., Ehrlich, S.D., Pop, M., Montel, M.-C., Irlinger, F., Renault, P., 2014. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. BMC Genomics 15, 1101. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1101

Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L.M., Briandet, R., Cotter, P.D., 2019. Biofilms in food processing environments: Challenges and opportunities. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 10, 173–195. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805

Andersen, H.J., Johansen, H.S., Shek, C.K., Skibsted, L.H., 1990. Nitric oxide exchange in nitrosylmyoglobin. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 191, 293–298. https://doi.org/10.1007/bf01202429

Angly, F.E., Dennis, P.G., Skarshewski, A., Vanwonterghem, I., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2014. CopyRighter: a rapid tool for improving the accuracy of microbial community profiles through lineage-specific gene copy number correction. Microbiome 2, 11. https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-11

ANSES, 2009. Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) 2006-2007. https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER-Ra-INCA2.pdf

ANSES, 2008. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés. https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2007sa0174.pdf

ANSES, 2006. Actualisation des repères du PNNS : révision des repères de consommations alimentaires- Rapport d'expertise collective. https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2012SA0103Ra-1.pdf

ANSES, 2017. Table CIQUAL de composition nutritionnelle des aliments. https://ciqual.anses.fr/

Argyri, A.A., Doulgeraki, A.I., Blana, V.A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2011. Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. Int. J. Food Microbiol. 150, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.010

Atlan, D., Béal, C., Chouyekh, H., Gaudu, P., Hols, P., Julliard, V., Ladero, V., Lortal, S., Loubière, P., Monnet, C., Monnet, V., Yvon, M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique., in: bactéries lactiques: de la génétique aux ferments. Edition TEC and DOC. 271–509.

Audenaert, K., D'Haene, K., Messens, K., Ruyssen, T., Vandamme, P., Huys, G., 2010. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiol. 27, 12–18. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.006

Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., Jacques, M.-A., 2015. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 81, 1257–1266. https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14

Bastide, N.M., Pierre, F.H.F., Corpet, D.E., 2011. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.) 4, 177–184. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113

Benson, A.K., David, J.R.D., Gilbreth, S.E., Smith, G., Nietfeldt, J., Legge, R., Kim, J., Sinha, R., Duncan, C.E., 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. https://doi.org/10.1128/AEM.00774-14

Binkerd, E.F., Kolari, O.E., 1975. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. Food Cosmet. Toxicol. 13, 655–661. https://doi.org/10.1016/0015-6264(75)90157-1

Birzele, B., Djordjević, S., Krämer, J., 2005. A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. Food Control, 7th Karlsruhe Nutrition Congress on Food Safety 16, 695–699. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.006

Björkroth, K.J., Korkeala, H.J., 1997. Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. Appl. Environ. Microbiol. 63, 448–453.

Björkroth, K.J., Vandamme, P., Korkeala, H.J., 1998. Identification and characterization of Leuconostoc carnosum, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3313–3319.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. Nat. Methods 10, 57–59. https://doi.org/10.1038/nmeth.2276

Borch, E., Molin, G., 1989. The aerobic growth and product formation of Lactobacillus, Leuconostoc, Brochothrix, and Carnobacterium in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 81–88. https://doi.org/10.1007/BF00256001

Borch, E., Nerbrink, E., Svensson, P., 1988. Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausage. Int. J. Food Microbiol. 7, 317–330. https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90058-X

Bredholt, S., Nesbakken, T., Holck, A., 1999. Protective cultures inhibit growth of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in cooked, sliced, vacuum and gas-packaged meat. Int. J. Food Microbiol. 53, 43–52.

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. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.009

Bryan, N.S., Alexander, D.D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L., Boffetta, P., 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. Food Chem. Toxicol. 50, 3646–3665. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.062

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10, 421. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421

Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, X.-Y., Torres Martinez, C., Maraj, S.R., Hughes, M.N., 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. Biochim. Biophys. Acta. 1411, 475–488. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00033-X

Cappuccio, F.P., Kalaitzidis, R., Duneclift, S., Eastwood, J.B., 2000. Unravelling the links be tween calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. J. Nephrol. 13, 169–177.

Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Aquilanti, L., Taccari, M., Garofalo, C., Polverigiani, S., Clementi, F., Franciosi, E., Tuohy, K., Mercuri, M.L., Altissimi, M.S., Haouet, M.N., 2018. Microbial dynamics of model Fabriano-like fermented sausages as affected by starter cultures, nitrates and nitrites. Int. J. Food Microbiol. 278, 61–72. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.032

Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., Ercolini, D., 2015. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. Food Microbiol., Spoilers, wonder spores and diehard microorganisms: New insights to integrate these super foes in food spoilage risk management 45, Part A, 83–102. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002

Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., Kjelleberg, S., 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 73, 278–288. https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06

Caudarella, R., Vescini, F., Rizzoli, E., Francucci, C.M., 2009. Salt intake, hypertension, and osteoporosis. J. Endocrinol. Invest. 32, 15–20.

Cerqueira, T., Barroso, C., Froufe, H., Egas, C., Bettencourt, R., 2018. Metagenomic signatures of microbial communities in deep-sea hydrothermal sediments of Azores vent fields. Microb. Ecol. 76, 387–403. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1144-x

Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Coq, A.-M.C.-L., 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. https://doi.org/10.1038/nbt1160

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. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202

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 Sci. 97, 332–338. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.009

Champomier-Vergès, M.-C., Stintzy, A., Meyer, J.-M., 1996. Acquisition of iron by the non-siderophore-producing Pseudomonas fragi. Microbiol. 142, 1191–1199.

Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., Norat, T., 2011. Red and processed meat and colorectal cancer Incidence: meta-analysis of prospective studies. PLoS ONE 6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020456

Chessel, D., Dufour, A.B., Thioulouse, J., 1987. The ade 4 package-I : One-table methods. http://pbil.univ-lyon1.fr/JTHome/ref/ade4-Rnews.pdf

Chikthimmah, N., Anantheswaran, R.C., Roberts, R.F., Mills, E.W., Knabel, S.J., 2001. Influence of sodium chloride on growth of lactic acid bacteria and subsequent destruction of Escherichia coli O157:H7 during processing of Lebanon bologna. J. Food Prot. 64, 1145–1150. https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.8.1145

Christian, J.H.B., 2000. Drying and reduction of water activity. https://books.google.fr/books?id=yB-VhPpQxv0C&pg=PA110&lpg=PA110&dq=Drying+and+reduction+of+water+activity.+christian+2000

Christiansen, L.N., Tompkin, R.B., Shaparis, A.B., Kueper, T.V., Johnston, R.W., Kautter, D.A., Kolari, O.J., 1974. Effect of sodium nitrite on toxin production by Clostridium botulinum in bacon. Appl. Microbiol. 27, 733–737.

Christieans, S., Picgirard, L., Parafita, E., Lebert, A., Gregori, T., 2018. Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in French dry fermented sausages. Meat Sci. 137, 160–167. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.028

Chung, K.-T., Dickson, J.S., Grouse, J.D., 1989. Attachment and proliferation of bacteria on meat. J. Food Prot. 52, 173–177. https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.3.173

Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D., 1996. Physiology of pyruvate metabolism in Lactococcus lactis. Antonie Van Leeuwenhoek 70, 253–267. https://doi.org/10.1007/BF00395936

Cogan, T.M., Jordan, K.N., 1994. Metabolism of Leuconostoc Bacteria. J. Dairy Sci. 77, 2704–2717. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77213-1

Cole, J.A., Brown, C.M., 1980. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. FEMS Microbiol. Lett. 7, 65–72. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1980.tb01578.x

Comi, G., Iacumin, L., 2012. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan cooked ham. Int. J. Food Sci. Technol. 47, 114–121.

Crosby, L.D., Criddle, C.S., 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. BioTechniques 34, 790–802. https://doi.org/10.2144/03344rr01

Cross, A.J., Ferrucci, L.M., Risch, A., Graubard, B.I.., Ward, M.H., Park, Y., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Sinha, R., 2010. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. Cancer Res. 70, 2406–2414. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3929

Dabassa, A., 2013. Evaluation of home slaughtered meat quality used for human consumption at household and food seller house in Jimma. 1, 38-44. https://doi.org/10.3923/jms.2013.779.784

Dahllöf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S., 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. Appl Env. Microbiol 66, 3376–3380.

Daneshvar Alavi, H.E., Truelstrup Hansen, L., 2013. Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of Listeria monocytogenes in single and dual species biofilms with Pseudomonas fluorescens, Serratia proteamaculans or Shewanella baltica on food-grade stainless steel surfaces. Biofouling 29, 1253–1268. https://doi.org/10.1080/08927014.2013.835805

De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J.A., Ercolini, D., 2016. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. Sci. Rep. 6, 21871. https://doi.org/10.1038/srep21871

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070222

de Graef, M.R., Alexeeva, S., Snoep, J.L., Teixeira de Mattos, M.J., 1999. The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in Escherichia coli. J. Bacteriol. 181, 2351–2357.

Devine, C., 2014. Encyclopedia of Meat Sciences. Elsevier. https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123847348/encyclopedia-of-meat-sciences

Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2015. 7 - Advanced methods for the identification, enumeration, and characterization of microorganisms in fermented foods, in: Holzapfel, W. (Ed.), Advances in fermented foods and beverages, woodhead publishing series in food science, technology and nutrition. Woodhead Publishing, pp. 157–176. https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00007-4

Dols, M., Chraibi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N.D., Monsan, P.F., 1997. Growth and energetics of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2159–2165.

Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. Int. J. Food Microbiol. 157, 130–141. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020

Doyle, E., 2010. Microbial food spoilage — Losses and control strategies. https://pdfs.semanticscholar.org/ec5b/16cb60801c2f626d64df4992aeee0e184342.pdf?_ga=2.110750214.280751751.1588515164-1127963489.1588515164

Doyle, M.E., Glass, K.A., 2009. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 9, 44–56. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x

Doyle, M.P., Roman, D.J., 1982. Response of Campylobacter jejuni to sodium chloride. Appl. Environ. Microbiol. 43, 561–565.

Du, R., Qiao, X., Zhao, F., Song, Q., Zhou, Q., Wang, Y., Pan, L., Han, Y., Zhou, Z., 2019. Corrigendum to "Purification, characterization and antioxidant activity of dextran produced by Leuconostoc pseudomesenteroides from homemade wine"[Carbohydr. Polym. 198 (2018) 529–536]. Carbohydr. Polym. 216, 331. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.006

Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarme, P., 2015. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. PLoS ONE 10, e0124360. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360

Duranton, F., Guillou, S., Simonin, H., Chéret, R., 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. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 16, 373–380.

Dušková, M., Kameník, J., Lačanin, I., Šedo, O., Zdráhal, Z., 2016. Lactic acid bacteria in cooked hams – Sources of contamination and chances of survival in the product. Food Control 61, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.019

Eakes, B.D., Blumer, T.N., 1975. Effect of various levels of potassium nitrate and sodium nitrite on color and flavor of cured loins and country-style hams. J. Food Sci. 40, 977–980. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb02247.x

EFSA, 2008. Nitrate in vegetables - Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. EFSA J. 6, 689. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.689

EFSA, 2003. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. EFSA J. 2, 14. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.14

Elmossalami, E., Wassef, N., 1971. Penetration of some microorganisms in meat. Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B 18, 329–336. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1971.tb01605.x

Eloe-Fadrosh, E.A., Ivanova, N.N., Woyke, T., Kyrpides, N.C., 2016. Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. Nat. Microbiol. 1, 1–4. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.32

Emerson, D., Agulto, L., Liu, H., Liu, L., 2008. Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. BioScience 58, 925–936. https://doi.org/10.1641/B581006

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. https://doi.org/10.1128/AEM.00256-13

Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., La Storia, A., Laghi, L., Mauriello, G., Guerzoni, M.E., Villani, F., 2011. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions . Appl. Environ. Microbiol. 77, 7372–7381. https://doi.org/10.1128/AEM.05521-11

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 Env. Microbiol 72, 4663–4671. https://doi.org/10.1128/AEM.00468-06

Erl-Höning, C., 2014. Psychrotolerante Hefen in vakuumverpacktem Fleisch (Text.PhDThesis). Ludwig-Maximilians-Universität München.

Erlich, H.A., Gelfand, D.H., Saiki, R.K., 1988. Specific DNA amplification. Nature 331, 461–462. https://doi.org/10.1038/331461a0

Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J.W., Yang, Y., Firestone, M.K., Alvarez-Cohen, L., Zhou, J., 2019. Microbial functional diversity: From concepts to applications. Ecol. Evol. 9, 12000–12016. https://doi.org/10.1002/ece3.5670

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinforma. Oxf. Engl. 34, 1287–1294. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791

Feng, F., Zhou, Q., Yang, Y., Zhao, F., Du, R., Han, Y., Xiao, H., Zhou, Z., 2018. Characterization of highly branched dextran produced by Leuconostoc citreum B-2 from pineapple fermented product. Int. J. Biol. Macromol. 113, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.119

Feng, G., Xie, T., Wang, X., Bai, J., Tang, L., Zhao, H., Wei, W., Wang, M., Zhao, Y., 2018. Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil. BMC Microbiol. 18, 11. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1152-5

Ferrer-Sueta, G., Radi, R., 2009. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. ACS Chem. Biol. 4, 161–177. https://doi.org/10.1021/cb800279q

Ferrocino, I., Bellio, A., Giordano, M., Macori, G., Romano, A., Rantsiou, K., Decastelli, L., Cocolin, L., 2018. Shotgun metagenomics and volatilome profile of the microbiota of fermented sausages. Appl. Environ. Microbiol. 84. https://doi.org/10.1128/AEM.02120-17

Ferrocino, I., Greppi, A., La Storia, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L., 2016. Impact of nisin-activated packaging on microbiota of beef burgers during storage. Appl. Environ. Microbiol. 82, 549–559. https://doi.org/10.1128/AEM.03093-15

FICT, 2016. Code des usages de la charcuterie. https://www.code-des-usages-charcuterie.fr/

FICT, Ministère de l'Agriculture, 2018. Production industrielle francaise 2018 : Charcuteries - Salaisons - Plats cuisinés - Charcuteries pâtissières - Conserves de viandes.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.00323-16

FranceAgriMer, 2019. Fiche filière viande porcine. https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/63230/document/FICHE%20FILIERE%20PORCINE.pdf

Franz, C.M.A.P., von Holy, A., 1996. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. Int. J. Food Microbiol. 29, 59–73. https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00022-4

Froehlich, D.A., Gullett, E.A., Usborne, W.R., 1983. Effect of Nitrite and Salt on the Color, Flavor and Overall Acceptability of Ham. J. Food Sci. 48, 152–154. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14811.x

Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D., Cocaign-Bousquet, M., 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in Lactococcus lactis: predominant role of the NADH/NAD+ ratio. J. Bacteriol. 179, 5282–5287.

Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. Mol. Biol. Evol. 14, 685–695. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808

Gastauer, M., Vera, M.P.O., de Souza, K.P., Pires, E.S., Alves, R., Caldeira, C.F., Ramos, S.J., Oliveira, G., 2019. A metagenomic survey of soil microbial communities along a rehabilitation chronosequence after iron ore mining. Sci. Data 6, 1–10. https://doi.org/10.1038/sdata.2019.8

Gavini, F., Delcenserie, V., Kopeinig, K., Pollinger, S., Beerens, H., Bonaparte, C., Upmann, M., 2006. Bifidobacterium species isolated from animal feces and from beef and pork meat. J. Food Prot. 69, 871–877. https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.4.871

Geeraerts, W., Pothakos, V., De Vuyst, L., Leroy, F., 2017. Diversity of the dominant bacterial species on sliced cooked pork products at expiration date in the Belgian retail. Food Microbiol. 65, 236–243. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.007

Gill, C. o., 1983. Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. J. Food Prot. 46, 444–452. https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.5.444

Gill, C.O., 1976. Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. J. Appl. Bacteriol. 41, 401–410. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1976.tb00652.x

Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science 312, 1355–1359. https://doi.org/10.1126/science.1124234

Godziszewska, J., Guzek, D., Pogorzelska, E., Brodowska, M., G _ orska-Horczyczak, E., Sakowska, A., Wojtasik-Kalinowska, Y., Gantner, M., Wierzbicka, A., 2017. A simple method of the detection of pork

spoilage caused by Rahnella aquatilis. Food Sci. Technol. 84. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.049

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol. Biol. Evol. 27, 221–224. https://doi.org/10.1093/molbev/msp259

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M., 2002. Food spoilage — interactions between food spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol., 18th International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygeine, August 18-23, 2002, Lillehammer Norway. Necessary and Unwanted Bacteria in Food - Microbial Adaption to changing Environments 78, 79–97. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7

Gribble, A., Brightwell, G., 2013. Spoilage characteristics of Brochothrix thermosphacta and campestris in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. Meat Sci. 94, 361–368. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.016

Ha, S.K., 2014. Dietary Salt Intake and Hypertension. Electrolytes Blood Press. E BP 12, 7–18. https://doi.org/10.5049/EBP.2014.12.1.7

Han, Y., Jiang, Y., Sun, X., Xu, B., Zhou, G., 2011. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. Meat Sci. 682–688.

Hanshew, A.S., Mason, C.J., Raffa, K.F., Currie, C.R., 2013. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. J. Microbiol. Methods 95, 149–155. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.007

Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. Microb. Ecol. 35, 1–21. https://doi.org/10.1007/s002489900056

Heip, C.H.R., Herman, P.M.J., Soetaert, K., 1998. Indices of diversity and evenness. Oceanis 4, 61–87.

Hoagland, R., 1914. Coloring matter of raw and cooked salted meats. J. Agric. Res. 3, 211-226.

Hoffman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformaion of Escherichia coli. Gene 57, 267–272. https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4

Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A., Nasu, M., 1998. Development of Helicobacter pylori-induced Gastric Carcinoma in Mongolian Gerbils. Cancer Res. 58, 4255–4259.

Hospital, X.F., Carballo, J., Fernández, M., Arnau, J., Gratacós, M., Hierro, E., 2015. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. Food Control 57, 275–281. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.024

Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2014. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of Salmonella Typhimurium. Food Res. Int. 62, 410–415. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.055

Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2012. Survival of Listeria innocua in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. Int. J. Food Microbiol. 153, 395–401. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.032

Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., Fernández, M., 2016. A study on the toxigenesis by Clostridium botulinum in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 218, 66–70. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.009

Huang, L., Zhao, J., Chen, Q., Zhang, Y., 2014. Nondestructive measurement of total volatile basic nitrogen (TVB-N) in pork meat by integrating near infrared spectroscopy, computer vision and electronic nose techniques. Food Chem. 145, 228–236. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.073

Hugas, M., Pagés, F., Garriga, M., Monfort, J.., 1998. Application of the bacteriocinogenicLactobacillus sakeiCTC494 to prevent growth of Listeria in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. Food Microbiol. 15, 639–650. https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0208

Hultman, J., Rahkila, R., Ali, J., Rousu, J., Björkroth, K.J., 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. https://doi.org/10.1128/AEM.02228-15

Illikoud, N., Gohier, R., Werner, D., Barrachina, C., Roche, D., Jaffrès, E., Zagorec, M., 2019a. Transcriptome and volatilome analysis during growth of Brochothrix thermosphacta in food: role of food substrate and strain specificity for the expression of spoilage functions. Food Microbiol. 10, 2527. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02527

Illikoud, N., Rossero, A., Chauvet, R., Courcoux, P., Pilet, M.-F., Charrier, T., Jaffrès, E., Zagorec, M., 2019b. Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium Brochothrix thermosphacta. Food Microbiol., Microbial Spoilers in Food 2017 Symposium 81, 22–31. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.015

INCa, 2015. Nutrition et prévention primaire des cancers : actualisation des données, collection État des lieux et des connaissances. https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Nutrition-et-prevention-primaire-des-cancers-actualisation-des-donnees

Jääskeläinen, E., Hultman, J., Parshintsev, J., Riekkola, M.-L., Björkroth, J., 2016. Development of spoilage bacterial community and volatile compounds in chilled beef under vacuum or high oxygen atmospheres. Int. J. Food Microbiol. 223, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.022

Jacobsen, T., Budde, B.B., Koch, A.G., 2003. Application of Leuconostoc carnosum for biopreservation of cooked meat products. J. Appl. Microbiol. 95, 242–249.

Johansson, P., Paulin, L., Säde, E., Salovuori, N., Alatalo, E.R., Björkroth, K.J., Auvinen, P., 2011. Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, Leuconostoc gasicomitatum LMG 18811T, in association with specific spoilage reactions. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4344–4351. https://doi.org/10.1128/AEM.00102-11

Jørgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P., 2000. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. J. Appl. Microbiol. 89, 920–934.

Jung, J.Y., Lee, S.H., Jin, H.M., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. Int. J. Food Microbiol. 163, 171–179. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.022

Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2264–2274. https://doi.org/10.1128/AEM.02157-10

Junttila, J., Hirn, J., Hill, P., Nurmi, E., 1989. Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of Listeria monocytogenes during the manufacture of fermented sausage. J. Food Prot. 52, 158–161. https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.3.158

Justé, A., Thomma, B.P.H.J., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. Food Microbiol. 25, 745–761. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.009

Kalschne, D.L., Womer, R., Mattana, A., Sarmento, C.M.P., Colla, L.M., Colla, E., 2015. Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham. Braz. J. Microbiol. 46, 173–181. https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130019

Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. J. Clin. Microbiol. 37, 3497–3503.

Keto-Timonen, R., Lindström, M., Puolanne, E., Niemistö, M., Korkeala, H., 2012. Inhibition of toxigenesis of group II (nonproteolytic) Clostridium botulinum type B in meat products by using a reduced level of nitrite. J. Food Prot. 75, 1346–1349. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-056

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. https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0

Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y.S., 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. https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111–120.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41, e1. https://doi.org/10.1093/nar/gks808

Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 2567–2572. https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102

Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P., Lindroth, S., 1989. Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. Int. J. Food Microbiol. 9, 237–247. https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90093-7

Kotzekidou, P., Bloukas, J.G., 1996. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham. Meat Sci. 44, 333–345.

Labadie, J., 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. Meat Sci. 52, 299–305. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00006-6

Lamkey, J.W., Leak, F.W., Tuley, W.B., Johnson, D.D., West, R.L., 1991. Assessment of sodium lactate addition to fresh pork sausage. J. Food Sci. 56.

Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fraqueza, M.J., Elias, M., 2017. Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. Food Chem. 218, 129–136. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.056

Larsson, S.C., Bergkvist, L., Wolk, A., 2006. Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. Int. J. Cancer 119, 915–919. https://doi.org/10.1002/ijc.21925

Larsson, S.C., Wolk, A., 2012. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. Br. J. Cancer 106, 603–607. https://doi.org/10.1038/bjc.2011.585

Lauritsen, C.V., Kjeldgaard, J., Ingmer, H., Bisgaard, M., Christensen, H., 2019. Microbiota encompassing putative spoilage bacteria in retail packaged broiler meat and commercial broiler abattoir. Int. J. Food Microbiol. 300, 14–21. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.003

Leathers, T.D., Bischoff, K.M., 2011. Biofilm formation by strains of Leuconostoc citreum and L. mesenteroides. Biotechnol. Lett. 33, 517–523. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0450-2

Leistner, L., 1992. Food preservation by combined methods. Food Preserv. Comb. Methods 25, 151–158.

Lenth, R.V., 2012. Surface Plots in the rsm Package. http://www2.uaem.mx/r-mirror/web/packages/rsm/vignettes/rsm-plots.pdf

Leroy, F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., De Vuyst, L., 2009. Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. Food Microbiol. 26, 94–102. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.005

Li, M.Y., Zhou, G.H., Xu, X.L., Li, C.B., Zhu, W.Y., 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. Food Microbiol. 23, 607–611. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.01.004

Li, X., Li, C., Ye, H., Wang, Z., Wu, X., Han, Y., Xu, B., 2019. Changes in the microbial communities in vacuum-packaged smoked bacon during storage. Food Microbiol. 77, 26–37. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.007

Li, X., Zhu, J., Li, C., Ye, H., Wang, Z., Wu, X., Xu, B., 2018. Evolution of volatile compounds and spoilage bacteria in smoked bacon during refrigeration using an E-Nose and GC-MS combined with partial least squares regression. Molecules 23, 3286. https://doi.org/10.3390/molecules23123286

Liang, R., Yu, X., Wang, R., Luo, X., Mao, Y., Zhu, L., Zhang, Y., 2012. Bacterial diversity and spoilage-related microbiota associated with freshly prepared chicken products under aerobic conditions at 4°C. J. Food Prot. 75, 1057–1062. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-439

Liu, H., Ivarsson, E., Dicksved, J., Lundh, T., Lindberg, J.E., 2012. Inclusion of chicory (cichorium intybus l.) in pigs' diets affects the intestinal microenvironment and the gut microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 78, 4102–4109. https://doi.org/10.1128/AEM.07702-11

Llamas-Arriba, M.G., Puertas, A.I., Prieto, A., López, P., Cobos, M., Miranda, J.I., Marieta, C., Ruas-Madiedo, P., Dueñas, M.T., 2019. Characterization of dextrans produced by Lactobacillus mali CUPV271 and Leuconostoc carnosum CUPV411. Food Hydrocoll. 89, 613–622. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.053

Lorenzo, J.M., Cachaldora, A., Fonseca, S., Gómez, M., Franco, I., Carballo, J., 2010. Production of biogenic amines "in vitro" in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages. Meat Sci. 86, 684–691. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.005

Love, J.D., Pearson, A.M., 1971. Lipid oxidation in meat and meat products—A review. J. Am. Oil Chem. Soc. 48, 547–549. https://doi.org/10.1007/BF02544559

Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8228–8235. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005

Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R., 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. ISME J. 5, 169–172. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133

Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., Knight, R., 2007. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1576–1585. https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06

Luber, P., 2009. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? Int. J. Food Microbiol., Food Micro 2008 "Evolving Microbial Food Safety and Quality" 1–4 September 2008, Aberdeen, Scotland, UK 134, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.012

Lucquin, I., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Chaillou, S., 2012. Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes. Food Microbiol. 187–196. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.001

Ma Yuan, He Feng J., MacGregor Graham A., 2015. High salt intake. Hypertension 66, 843–849. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05948

Macfarlane, J.J., Schmidt, G.R., Turner, R.H., 1977. Binding of meat pieces: a comparison of myosin, actomyosin and sarcoplasmic proteins as binding agents. J. Food Sci. 42, 1603–1605. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb08437.x

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2, e593. https://doi.org/10.7717/peerj.593

Maia Danielski, G., Didimo Imazaki, P.H., Daube, G., Ernlund Freitas de Macedo, R., Clinquart, A., 2017. In vitro evaluation of the competing effect of Carnobacterium maltaromaticum isolated from vacuum packed meat against food pathogens.

Majou, D., Christieans, S., 2018. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. Meat Sci. 145, 273–284. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013

Mansour, S., Beckerich, J.M., Bonnarme, P., 2008. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast Yarrowia lipolytica. Appl. Environ. Microbiol. 74, 6505–6512. https://doi.org/10.1128/AEM.01519-08

Marshall, B.J., Ohye, D.F., Christian, J.H.B., 1971. Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. Appl. Microbiol. 21, 363–364.

Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 17, 10–12. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200

Martin, W.F., Garg, S., Zimorski, V., 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 370. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0330

Mataragas, M., Drosinos, E.H., Metaxopoulos, J., 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. Food Microbiol. 20.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PloS ONE 8, e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Mellor, G.E., Bentley, J.A., Dykes, G.A., 2011. Evidence for a role of biosurfactants produced by Pseudomonas fluorescens in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. Food Microbiol. 28, 1101–1104. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.003

Meneton, P., Jeunemaitre, X., de Wardener, H.E., Macgregor, G.A., 2005. Links Between Dietary Salt Intake, Renal Salt Handling, Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases. Physiol. Rev. 85, 679–715. https://doi.org/10.1152/physrev.00056.2003

Metaxopoulos, J., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2002. Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. J. Appl. Microbiol. 93, 363–373. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01701.x

Miller, P., Liu, X., McMullen, L.M., 2014. Microbiota of regular sodium and sodium-reduced ready-to-eat meat products obtained from the retail market. Can. J. Microbiol. 61, 150–154. https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0630

Mol, J.H.H., Hietbrink, J.E.A., Mollen, H.W.M., Tinteren, J.V., 1971. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. J. Appl. Bacteriol. 34, 377–397. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1971.tb02297.x

Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel, M.-C., 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. Dairy Sci. Technol. 92, 265–278. https://doi.org/10.1007/s13594-012-0064-7

Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A.D., Dusemund, B., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Lambré, C., Leblanc, J.-C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Oskarsson, A., Parent-Massin, D., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Brandt, P. van den, Fortes, C., Merino, L., Toldrà, F., Arcella, D., Christodoulidou, A., Abrahantes, J.C., Barrucci, F., Garcia, A., Pizzo, F., Battacchi, D., Younes, M., 2017. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. EFSA J. 15, e04786. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786

Nagy, E., Dlauchy, D., Medeiros, A.O., Péter, G., Rosa, C.A., 2014. Yarrowia porcina sp. nov. and Yarrowia bubula f.a. sp. nov., two yeast species from meat and river sediment. Antonie Van Leeuwenhoek 105, 697–707. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0125-4

Ngoan, L.T., Yoshimura, T., 2003. Work, salt intake and the development of stomach cancer. Med. Hypotheses 60, 552–556. https://doi.org/10.1016/S0306-9877(03)00014-8

Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G., Arneborg, N., 2008. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. Meat Sci. 80, 919–926. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.04.011

Nieminen, T.T., Koskinen, K., Laine, P., Hultman, J., Säde, E., Paulin, L., Paloranta, A., Johansson, P., Björkroth, J., Auvinen, P., 2012. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. Int. J. Food Microbiol. 157, 142–149. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.016

Nieminen, T.T., Nummela, M., Björkroth, J., 2015. Packaging gas selects lactic acid bacterial communities on raw pork. J. Appl. Microbiol. 119, 1310–1316. https://doi.org/10.1111/jam.12890

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. https://doi.org/10.1079/PHN2003592

Octavia, S., Lan, R., 2014. The family Enterobacteriaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 225–286. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_167

Ohye, D.F., Christian, J.H.B., 1967. Combined effects of temperature, pH, and water activity on growth and toxin production by Clostridium botulinum types A, B, and E. Botulism 217–223.

Parthasarathy, D.K., Bryan, N.S., 2012. Sodium nitrite: The "cure" for nitric oxide insufficiency. Meat Sci., 58th International Congress of Meat Science and Technology (58th ICoMST) 92, 274–279. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.001

Peirson, M.D., Guan, T.Y., Holley, R.A., 2003. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discolouration. Int. J. Food Microbiol. 86, 223–230. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00548-2

Perea-Sanz, L., Montero, R., Belloch, C., Flores, M., 2018. Nitrate reduction in the fermentation process of salt reduced dry sausages: Impact on microbial and physicochemical parameters and aroma profile. Int. J. Food Microbiol. 282, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.004

Pierre, F., 2019. Association positive entre la consommation de viandes rouges, de charcuteries et le risque de cancer du côlon : vers une prévention par modification des modes de production et d'élevage ? Communication CIAG.

https://www6.inrae.fr/ciag/CIAg-Alimentation/Ameliorer-la-qualite-nutritionnelle-des-aliments

Pierson, M.D., Smoot, L.A., Robach, M.C., 1983. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of clostridium botulinum in cured meats. C. R. C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 17, 141–187. https://doi.org/10.1080/10408398209527346

Pietrasik, Z., Gaudette, N.J., 2015. The effect of salt replacers and flavor enhancer on the processing characteristics and consumer acceptance of turkey sausages. J. Sci. Food Agric. 95, 1845–1851. https://doi.org/10.1002/jsfa.6885

Piotrowska-Cyplik, A., Myszka, K., Czarny, J., Ratajczak, K., Kowalski, R., Biegańska-Marecik, R., Staninska-Pięta, J., Nowak, J., Cyplik, P., 2017. Characterization of specific spoilage organisms (SSOs) in vacuum-packed ham by culture-plating techniques and MiSeq next-generation sequencing technologies. J. Sci. Food Agric. 97, 659–668. https://doi.org/10.1002/jsfa.7785

Pitt, J., Richardson, K., 1973. Spoilage by preservative-resistant yeast. Food Res. Q 80–85.

Pitt, J.I., Miscamble, B.F., 1995. Water relations of aspergillus flavus and closely related species. J. Food Prot. 58, 86–90. https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.1.86

Poirier, S., Rué, O., Coeuret, G., Champomier-Vergès, M.-C., Loux, V., Chaillou, S., 2018a. Detection of an amplification bias associated to Leuconostocaceae family with a universal primer routinely used for monitoring microbial community structures within food products. BMC Res. Notes 11. https://doi.org/10.1186/s13104-018-3908-2

Poirier, S., Rué, O., Peguilhan, R., Coeuret, G., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.-C., Loux, V., Chaillou, S., 2018b. Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using gyrB amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. PLoS ONE 13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204629

Pothakos, V., Aulia, Y.A., Van der Linden, I., Uyttendaele, M., Devlieghere, F., 2015a. Exploring the strain-specific attachment of Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum on food contact surfaces. Int. J. Food Microbiol. 199, 41–46. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.008

Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., Ercolini, D., 2015b. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. Meat Sci., 61st International Congress of Meat science and Technology (61st ICoMST), 23-28 August 2015, Clermont Ferrand, France 109, 66–74. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014

Pothakos, V., Stellato, G., Ercolini, D., Devlieghere, F., 2015c. Processing environment and ingredients are both sources of Leuconostoc gelidum, which emerges as a major spoiler in ready-to- eat meals. Appl. Environ. Microbiol. 81, 13.

Praphailong, W., Fleet, G.H., 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. Food Microbiol. 14, 459–468. https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0106

Prolo, C., Álvarez, M.N., Radi, R., 2014. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. BioFactors Oxf. Engl. 40, 215–225. https://doi.org/10.1002/biof.1150

Qin, Q.-L., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., Zhou, J., Oren, A., Zhang, Y.-Z., 2014. A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. J. Bacteriol. 196, 2210–2215. https://doi.org/10.1128/JB.01688-14

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41, D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Quijada, N.M., De Filippis, F., Sanz, J.J., García-Fernández, M.D.C., Rodríguez-Lázaro, D., Ercolini, D., Hernández, M., 2018. Different Lactobacillus populations dominate in "Chorizo de León" manufacturing performed in different production plants. Food Microbiol. 70, 94–102. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.009

Raimondi, S., Luciani, R., Sirangelo, T.M., Amaretti, A., Leonardi, A., Ulrici, A., Foca, G., D'Auria, G., Moya, A., Zuliani, V., Seibert, T.M., Søltoft-Jensen, J., Rossi, M., 2019. Microbiota of sliced cooked ham packaged in modified atmosphere throughout the shelf life: Microbiota of sliced cooked ham in MAP. Int. J. Food Microbiol. 289, 200–208. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.017

Raimondi, S., Nappi, M.R., Sirangelo, T.M., Leonardi, A., Amaretti, A., Ulrici, A., Magnani, R., Montanari, C., Tabanelli, G., Gardini, F., Rossi, M., 2018. Bacterial community of industrial raw sausage packaged in modified atmosphere throughout the shelf life. Int. J. Food Microbiol. 280, 78–86. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.041

Ramaroson, M., Guillou, S., Rossero, A., Rezé, S., Anthoine, V., Moriceau, N., Martin, J.-L., Duranton, F., Zagorec, M., 2018. Selection procedure of bioprotective cultures for their combined use with High Pressure Processing to control spore-forming bacteria in cooked ham. Int. J. Food Microbiol. 276, 28–38. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.010

Redondo-Solano, M., Valenzuela-Martinez, C., Cassada, D.A., Snow, D.D., Juneja, V.K., Burson, D.E., Thippareddi, H., 2013. Effect of meat ingredients (sodium nitrite and erythorbate) and processing (vacuum storage and packaging atmosphere) on germination and outgrowth of Clostridium perfringens spores in ham during abusive cooling. Food Microbiol. 35, 108–115. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.008

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. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009

Richards, M.P., 2013. Redox reactions of myoglobin. Antioxid. Redox Signal. 18, 2342–2351. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4887

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 Microbiol. 70, 7–16. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.013

Roux, S., Enault, F., Bronner, G. le, Debroas, D., 2011. Comparison of 16S rRNA and protein-coding genes as molecular markers for assessing microbial diversity (Bacteria and Archaea) in ecosystems. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 617–628. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01190.x

Säde, E., Penttinen, K., Björkroth, J., Hultman, J., 2017. Exploring lot-to-lot variation in spoilage bacterial communities on commercial modified atmosphere packaged beef. Food Microbiol. 62, 147–152. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.004

Sakhaee, K., Harvey, J.A., Padalino, P.K., Whitson, P., Pak, C.Y., 1993. The potential role of salt abuse on the risk for kidney stone formation. J. Urol. 150, 310–312. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35468-x

Samelis, J., Björkroth, J., Kakouri, A., Rementzis, J., 2006. Leuconostoc carnosum associated with spoilage of refrigerated whole cooked hams in Greece. J. Food Prot. 69, 2268–2273. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2268

Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G., Metaxopoulos, J., 1998. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. J. Appl. Microbiol. 84, 649–660.

Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J., 2000. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. Int. J. Food Microbiol. 56, 133–143. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00190-7

Sanders, P.W., 1996. Salt-sensitive hypertension: Lessons from animal models. Am. J. Kidney Dis. 28, 775–782. https://doi.org/10.1016/S0272-6386(96)90265-6

Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P., Flores, J., 1997. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. Int. J. Food Microbiol. 37, 225–229. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00060-3

Scott, W.J., 1953. Water relations of Staphylococcus aureus at 30 degrees C. Aust. J. Biol. Sci. 6, 549–564.

Shahi, S.K., Freedman, S.N., Mangalam, A.K., 2017. Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. Gut Microbes 8, 607–615. https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1349041

Siegel, D.G., Schmidt, G.R., 1979. Ionic, pH, and temperature effects on the binding ability of myosin. J. Food Sci. 44, 1686–1689. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb09116.x

Signorini, M., Ponce-Alquicira, E., Guerrero-Legarreta, I., 2003. Proteolytic and lipolytic changes in beef inoculated with spoilage microorganisms and bioprotective lactic acid bacteria. Int. J. Food Prop. 6, 147–163. https://doi.org/10.1081/JFP-120016631

Snoep, J.L., Teixeira de Mattos, M.J., Starrenburg, M.J., Hugenholtz, J., 1992. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis. J. Bacteriol. 174, 4838–4841. https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4838-4841.1992

Stellato, G., La Storia, A., De Filippis, F., Borriello, G., Villani, F., Ercolini, D., 2016. Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. Appl. Environ. Microbiol. 82, 4045–4054. https://doi.org/10.1128/AEM.00793-16

Stern, A.M., Liu, B., Bakken, L.R., Shapleigh, J.P., Zhu, J., 2013. A novel protein protects bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide. J. Bacteriol. 195, 4702–4708. https://doi.org/10.1128/JB.00836-13

Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R.K., Schmidt, T.M., 2015. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. Nucleic Acids Res. 43, D593–D598. https://doi.org/10.1093/nar/gku1201

Taormina, P., 2010. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50, 209–227. https://doi.org/10.1080/10408391003626207

Tapia de Daza, M.S., Villegas, Y., Martinez, A., 1991. Minimal water activity for growth of Listeria monocytogenes as affected by solute and temperature. Int. J. Food Microbiol. 14, 333–337. https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90125-9

Tash, K., 2005. Rahnella aquatilis bacteremia from a suspected urinary source. J. Clin. Microbiol. 43, 2526–2528.

Thomas, C., 2014. Préservation de l'arôme dans un jambon cuit non nitrité. Thèse de doctorat. École doctorale des sciences de la vie, santé, agronomie, environnement (Clermont-Ferrand)

Thompson, J., Gentry-Weeks, C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques. Lorica-Uriage. Editions de Roissard. 1, 239-290.

Tian, X., Wu, W., Yu, Q., Hou, M., Gao, F., Li, X., Dai, R., 2017. Bacterial diversity analysis of pork longissimus lumborum following long term ohmic cooking and water bath cooking by amplicon sequencing of 16S rRNA gene. Meat Sci. 123, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.09.007

Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Sato, H., 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. PLoS ONE 7, e40863. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863

Tully, B.J., Graham, E.D., Heidelberg, J.F., 2018. The reconstruction of 2,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans. Sci. Data 5, 1–8. https://doi.org/10.1038/sdata.2017.203

Tuomisto, H., 2012. An updated consumer's guide to evenness and related indices. Oikos 121, 1203–1218. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19897.x

Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F., 2010. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. Food Microbiol. 27, 77–84. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.08.008

Vasilopoulos, C., Ravyts, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F., 2008. Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. J. Appl. Microbiol. 104, 1341–1353. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03664.x

Vercammen, A., Vanoirbeek, C., Lurquin, I., Steen, L., Goemaere, O., Szczepaniak, S., Paelinck, H., Hendrickx, M., Michiels, C., 2011. Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 12, 416–415.

Verce, M., De Vuyst, L., Weckx, S., 2019. Shotgun Metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel Oenococcus species. Front. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479

Vermassen, A., de la Foye, A., Loux, V., Talon, R., Leroy, S., 2014. Transcriptomic analysis of Staphylococcus xylosus in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress. Front. Microbiol. 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00691

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2006. Co-culture experiments demonstrate the usefulness of Lactobacillus sakei 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. Int. J. Food Microbiol. 108, 68–77. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.001

Větrovský, T., Baldrian, P., 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. PLoS ONE 8, e57923. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923

Vihavainen, E., Lundström, H.-S., Susiluoto, T., Koort, J., Paulin, L., Auvinen, P., Björkroth, K.J., 2007. Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1136–1145. https://doi.org/10.1128/AEM.01644-06

Visser, W., Scheffers, W., Batenburg-van der Vegte, W., van Dijken, J., 1990. Oxygen requirements of yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3785–3792.

Walsh, A.M., Crispie, F., Daari, K., O'Sullivan, O., Martin, J.C., Arthur, C.T., Claesson, M.J., Scott, K.P., Cotter, P.D., 2017. Strain-level metagenomic analysis of the fermented dairy beverage nunu highlights potential food safety risks. Appl. Environ. Microbiol. 83. https://doi.org/10.1128/AEM.01144-17

Wang, C., Chen, S., Zhang, H., Li, Y., Hu, X., 2018. Characterization of the inserted mutagenesis dextransucrases from Leuconostoc mesenteroides 0326 to produce hyperbranched dextran. Int. J. Biol. Macromol. 112, 584–590. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.001

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5261–5267. https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07

Wang, X.-Q., Terry, P.D., Yan, H., 2009. Review of salt consumption and stomach cancer risk: Epidemiological and biological evidence. World J. Gastroenterol. 15, 2204–2213. https://doi.org/10.3748/wjg.15.2204

Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., Nakao, M., 1998. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. Gastroenterology 115, 642–648. https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70143-x

Werner, J.J., Koren, O., Hugenholtz, P., DeSantis, T.Z., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Angenent, L.T., Knight, R., Ley, R.E., 2012. Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. ISME J. 6, 94–103. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.82

Wheatley, P., Giotis, E.S., McKevitt, A.I., 2014. Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. Ir. Vet. J. 67, 1. https://doi.org/10.1186/2046-0481-67-1

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. 38 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, Thomas J.

(Eds.), PCR Protocols. Academic Press, San Diego, pp. 315–322. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Wickham, H., 2010. ggplot2: Elegant graphics for data analysis, 1st ed. 2009. Corr. 3rd printing 2010. ed. Springer-Verlag New York Inc., New York.

Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M., Huang, T., Li, R., 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. Sci. Rep. 4, 4089. https://doi.org/10.1038/srep04089

Zagdoun, M., Coeuret, G., N'Dione, M., Champomier-Vergès, M-C., Chaillou, S., 2020. Large microbiota survey reveals how the microbial ecology of cooked ham is shaped by different processing steps. Food Microbiol. https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103547

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinforma. Oxf. Engl. 30, 614–620. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593

Zhang, X., Xu, W., Liu, Y., Cai, M., Luo, Z., Li, M., 2018. Metagenomics reveals microbial diversity and metabolic potentials of seawater and surface sediment from a hadal biosphere at the yap trench. Front. Microbiol. 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02402

Zhao, F., Zhou, G., Ye, K., Wang, S., Xu, X., Li, C., 2015. Microbial changes in vacuum-packed chilled pork during storage. Meat Sci. 100, 145–149. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.004

Zingarelli, B., O'Connor, M., Wong, H., Salzman, A.L., Szabó, C., 1996. Peroxynitrite -mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. 156, 350–358.

université PARIS-SACLAY

ECOLE DOCTORALE N°581

AGRICULTURE, ALIMENTATION, BIOLOGIE, ENVIRONNEMENT ET SANTE (ABIES)

Titre : Caractérisation de l'influence de facteurs environnementaux sur l'écologie microbienne du jambon cuit tranché.

Mots clés : écologie microbienne ; jambon cuit ; métagénétique ; altération ; sel ; nitrite

Résumé : Réduire le sel et le nitrite utilisés pour la conservation du jambon est un enjeu de santé publique, mais cette réduction est susceptible de modifier les écosystèmes microbiens et de favoriser le développement de l'altération des produits. L'objectif de ces travaux était de caractériser i) les communautés microbiennes de jambons issus d'une usine de fabrication ii) leurs productions de métabolites d'altération et de prévoir l'évolution de ces deux facteurs dans le cadre d'une réduction de sel et de nitrite.

Parmi les paramètres de production étudiés, nous avons montré que la ligne de tranchage était un facteur capital. Deux grands profils de communautés ont été observés à la date limite de conservation en fonction de la ligne de tranchage, composés de neuf espèces représentant 95% d'abondance relative dans les échantillons. La présence de ces espèces était corrélée à différents profils de production de métabolites issus de la fermentation du pyruvate. Sur la base des espèces identifiées, nous avons élaboré une communauté synthétique que nous avons inoculée sur un milieu de jambon synthétique à différentes concentrations en sel et en nitrite. Cette approche d'écologie synthétique a permis de montrer qu'une réduction en deçà du seuil de 12 g/kg de sel et de 25-30 mg/kg de nitrite entraînait un déséquilibre d'abondances lié à une croissance exponentielle des *Leuconostoc* et à une diminution de la croissance des *Carnobacterium*.

Ce déséquilibre s'accompagnait d'une augmentation de la production d'éthanol et d'acide D-lactique de 30%, suggérant un risque d'altération des jambons plus élevé à ces concentrations. Nous avons ensuite testé l'effet de ces concentrations à l'échelle pilote de production. Les comportements microbiens étaient très différents selon les profils de communautés de jambons issus des deux lignes de tranchage. Pour le premier profil, un comportement similaire à celui de l'écosystème synthétique a été observé, avec un déséquilibre d'abondances en dessous du seuil de 12 g/kg de sel et de 25-30 mg/kg de nitrite et une diminution de l'abondance de *Carnobacterium divergens*. Pour le deuxième profil, dominé par *Serratia proteamaculans*, la structure de la communauté était très peu impactée par une réduction de sel et de nitrite. Enfin, sur tous les jambons, nous avons observé qu'une réduction de sel et de nitrite favorisait la croissance de levures.

Ces travaux mettent en lumière l'importance du procédé sur la structuration des communautés microbiennes. Ce facteur est à prendre en compte pour comprendre l'impact de tout autre changement environnemental sur les comportements microbiens.

Title: Characterization of environmental factors' influence on microbial ecology of sliced cooked ham.

Keywords: microbial ecology; cooked ham; metagenetic; spoilage; salt; nitrite

Abstract: Reducing salt and nitrite used to limit cooked ham spoilage is a public health concern, but it can lead to changes in microbial ecosystems and enhance ham spoilage. Our objective was to characterize (i) the microbial communities of hams from a production plant, (ii) the production of spoilage metabolites and to predict how those factors would change in the context of a reduction in the salt and the nitrite content. Among the process parameters studied, the slicing line was an important factor. Two profiles of communities were observed at the use-by date according to the slicing line. They were composed of nine species representing 95% of abundance. The presence of those species was correlated with different productions of pyruvate-derived fermentation metabolites.

Based on the species identified, we designed a synthetic bacterial community that we inoculated on a synthetic ham-like agar medium with different salt and nitrite concentrations. This synthetic ecology approach showed that a reduction under 12 g/kg of salt and 25-30 mg/kg of nitrite correlated with a stronger species disequilibrium, associated with an exponential *Leuconostoc* growth and a decreased *Carnobacterium* growth.

This disequilibrium was correlated to a 30% increase of ethanol and D-lactic acid production, which suggests a higher spoilage risk for hams at those concentrations. We then tested those concentrations in industrial condition of production. Microbial behavior was very different according to the profiles of community of hams sliced on the different lines. For the first profile, the behavior of the community was similar to the one observed in the synthetic ecosystem: we observed a disequilibrium of species abundance under 12 g/kg of salt and 25-30 mg/kg of nitrite and a decrease in *Carnobacterium divergens* abundance. For the second profile, dominated by *Serratia proteamaculans*, community structure was only slightly affected by a reduction of salt and nitrite. Finally, we observed that reducing the salt and the nitrite content increased yeasts growth.

This work highlights the importance of process in the structuration of microbial communities in the final product. This factor is to take into account to understand the impact of any other environmental change on microbial behavior.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France