

Des staphylocoques utiles pour nos salaisons et fromages

THÉMATIQUE DE RECHERCHE :

Qualité microbiologique
des produits
et des procédés

Les aliments fermentés constituent un héritage culturel et gastronomique de grande valeur. Leur qualité sensorielle est largement tributaire des communautés microbiennes dont les staphylocoques. L'évaluation de la diversité des staphylocoques à coagulase négative et des facteurs de risques associés a constitué un des objectifs de l'Unité Microbiologie de l'Inra dont une partie des travaux s'est déroulée en collaboration avec les partenaires du projet européen Tradisausage et des projets de l'Agence nationale de la recherche SCN/BEER et Genoferment.

En France comme en Europe, les produits fermentés ont un fort impact économique et doivent concilier qualités sensorielles et sanitaires. Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont naturellement présents dans de nombreux fromages et salaisons et certaines espèces sont utilisées comme ferments. Ils interviennent dans le développement des qualités organoleptiques assurant la typicité et la diversité de ces produits. Cependant plusieurs études décrivent des souches de SCN isolées des aliments qui expriment des facteurs de risque. L'innocuité sanitaire des SCN est ainsi remise en cause. Il est donc nécessaire d'intégrer le critère d'innocuité des espèces et des souches utilisées pour la sélection de ferments selon les recommandations de l'Agence française de la sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et la réflexion de l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (Efsa) sur la démarche de qualification de présomption d'innocuité (Qualified presumption of safety - QPS).

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Diversité des espèces de staphylocoques dans les saucissons et les fromages

L'identification des staphylocoques est primordiale car certaines espèces ont un intérêt technologique et d'autres sont pathogènes. Le développement d'outils basés sur des méthodes génotypiques, une PCR multiplex permettant d'authentifier l'appartenance au genre *Staphylococcus* et à 4 espèces (*aureus*, *saprophyticus*, *epidermidis* et *xylosus*) et une puce d'oligonucléotides, rend possible la reconnaissance de 40 espèces et sous espèces de staphylocoques. Ces outils ont révélé la diversité des espèces dans deux aliments fermentés (salaisons, fromages) et dans leur environnement de fabrication : une quinzaine d'espèces ont pu être identifiées, parmi lesquelles *equorum* et *xylosus* dominent.

Diversité et innocuité des souches de *S. xylosus*

Notre équipe a focalisé ses recherches sur *S. xylosus*, l'une des deux espèces dominantes dans les aliments naturellement fermentés et dans leur environnement de fabrication. Elle est par ailleurs couramment utilisée comme ferment pour les produits carnés et pour certains fromages. Cette espèce joue un rôle important dans le processus de fermentation en contribuant au développement de la saveur des produits fermentés. Elle est historiquement reconnue comme non pathogène bien que certaines souches aient été associées à des pathologies animales et à des infections nosocomiales. ➔

➤ L'étude de souches de différentes origines a révélé une grande diversité phénotypique et génotypique. Les souches peuvent cependant se diviser en deux groupes, souches alimentaires ou environnement de fabrication et souches potentiellement à risques, associées à des infections animales. L'évaluation des facteurs de risques (toxines, résistances aux antibiotiques, amines biogènes...) présents chez des souches d'origine majoritairement alimentaire par des méthodes génotypiques (puce à ADN) n'a pas mis en évidence de gène codant pour des toxines. Seuls des déterminants pour la résistance à certains antibiotiques ont été identifiés. L'ensemble de ces résultats conforte l'utilisation de *S. xyloso* dans la fabrication des produits fermentés.

Maîtriser les qualités sanitaires : développement d'un ferment indigène et mise en œuvre d'un guide de bonnes pratiques

La maîtrise des qualités sanitaires des produits est un défi permanent pour les différents acteurs de l'agroalimentaire alors que les producteurs traditionnels rencontrent des difficultés techniques et financières pour répondre aux normes officielles de sécurité alimentaire. Dans ce contexte, le projet européen Tradisausage avait pour objectif d'évaluer et d'améliorer la sécurité des saucissons traditionnels du producteur jusqu'au consommateur, tout en préservant la typicité des produits et pour ambition de donner aux producteurs traditionnels les moyens de proposer des produits sûrs, répondant en particulier aux normes d'hygiène européennes.

Le développement d'un ferment indigène, composé de souches de *S. equorum* (espèce dominante) et *S. succinus* (espèce présente) en association avec *Lactobacillus sakei*, sélectionnées après vérification de leur innocuité, a permis de répondre à l'objectif d'amélioration de la sécurité sanitaire (réduction des populations de *Listeria monocytogenes* et d'entérocoques et du taux d'amines biogènes) et de maintien de la saveur des saucissons fermiers.

La mise en œuvre d'un guide de bonnes pratiques d'hygiène a permis de proposer aux producteurs un outil de travail original et de permettre aux agriculteurs et artisans de l'Europe de fabriquer des produits de charcuterie répondant aux règles de sécurité alimentaire mises en place par la législation communautaire. Ce guide comporte 4 parties : une première sous forme de fiches intitulées « fiches de recommandation » identifie les points critiques à surveiller tout au long de la chaîne de fabrication et les actions de maîtrise proposées et/ou recommandées, une deuxième intitulée « pour plus d'informations » relate les bonnes pratiques à appliquer dans les ateliers fermiers, une troisième avec des exemples de fiches de contrôles permet aux producteurs de tracer et d'améliorer les points critiques rencontrés et une quatrième rassemble les textes réglementaires et les normes. L'ensemble des résultats sur les ateliers français a été diffusé à la profession via la publication d'un numéro spécial de la revue Viandes et Produits Carnés (2006, volume 25) et via le site Internet.

<http://www.clermont.inra.fr/tradisausage>

Du génome à l'expression *in situ* en matrices alimentaires

Dans un contexte de mondialisation des réglementations, l'avenir des aliments fermentés est plus que jamais lié à une maîtrise complète des microorganismes mis en œuvre : innocuité des souches, résistance au stress technologique et maîtrise des qualités organoleptiques. Les écosystèmes microbiens associés aux produits fermentés sont complexes, avec plusieurs espèces en interaction entre elles et avec la matrice. Pour être compris et maîtrisé, le comportement microbien doit être exploré directement dans l'aliment. La séquence complète du génome de la souche *S. xyloso* C2a, finalisée en 2007, a d'ores et déjà permis de développer une puce à ADN spécifique dans la perspective d'étudier l'expression des gènes de *S. xyloso* dans des matrices alimentaires seul ou en association avec d'autres bactéries d'intérêt technologique et de mettre en lumière les mécanismes d'adaptation qui prévalent dans chaque situation.

Useful staphylococci in cured meats and cheeses

RESEARCH AREA:

Microbiological quality of products and processes

Fermented foods constitute a cultural and gastronomic heritage of considerable value. Their sensorial qualities are largely dependent on microbial communities, including those of staphylococci. Determining the diversity of coagulase-negative staphylococci and their associated risk factors has been one of the objectives of the Inra Microbiology Unit. Some of its work has been carried out in collaboration with partners in the European Tradisausage programme, as well as the SCN/BEER and Genoferment projects sponsored by the French National Research Agency (ANR).

In France, and more widely in Europe, fermented products are of considerable economic importance and it is necessary reconcile their sensorial and health qualities. Coagulase-negative staphylococci (CNS) are naturally present in numerous cheeses and cured meats, and some species are used as ferments. They are involved in the development of organoleptic qualities that ensure the typicality and diversity of these products. However, several studies have described CNS strains isolated from foods as constituting risk factors. The health safety of CNS has thus been called into question. It is therefore necessary to integrate a safety criterion concerning species and strains when selecting ferments, in accordance with the guidelines issued by the French Food Safety Agency (AFSSA) and the recommendations of the European Food Safety Authority (EFSA) regarding the Qualified Presumption of Safety (QPS).

STATE OF THE ART

Diversity of staphylococcus species in sausages and cheeses

The identification of staphylococci is essential because some species are of technological value while others may be pathogenic. The development of tools based on genotyping methods, a multiplex PCR that can authenticate membership of the *Staphylococcus* genus and of four species (*aureus*, *saprophyticus*, *epidermidis* and *xylosus*) and an oligonucleotide chip, have made it possible to recognise 40 species and subspecies of staphylococci. These tools have revealed the diversity of species present in two types of fermented foods (cured meats, cheeses) and in their manufacturing environment: it has thus been possible to identify some fifteen species, amongst which *equorum* and *xylosus* predominate.

Diversity and safety of *S. xylosus* strains

Our team has focused its research on *S. xylosus*, one of the two species predominating in naturally fermented foods and in their manufacturing environment. It is also widely used as a ferment for meat products and some cheeses. This species plays an important role in the fermentation process by contributing to flavour development in fermented products. It is historically recognised as being non-pathogenic, although some strains have been associated with animal diseases and hospital-acquired infections.



➤ The study of strains from different sources has revealed their broad phenotypic and genotypic diversity. However, the strains can be divided into two groups: those found in foods or in the manufacturing environment, and potentially risky strains associated with animal infections. Evaluation using genotyping methods (DNA chip) of the risk factors (toxins, antibiotic resistance, biogenic amines, etc.) associated with strains of mainly food origin did not demonstrate any gene coding for toxins. Only determinants for resistance to certain antibiotics could be identified. Overall, these results confirmed the validity of using *S. xylosum* in the manufacture of fermented products.

Controlling health quality: the development of an indigenous ferment and the publication of Good Practice guidelines

Control of the health quality of products is a constant challenge for different actors in the agri-food industry, while traditional producers encounter technical and financial obstacles to meeting official food safety standards. In this context, the European Tradisausage project was designed to evaluate and improve the safety of traditional sausages, from the producer to the consumer, while preserving the typicality of products and providing traditional producers with the means to offer safe products that would, in particular, meet European hygiene standards.

The development of an indigenous ferment, made of strains of *S. equorum* (dominant species) and *S. succinus* (also present), in association with *Lactobacillus sakei*, selected after verification of their safety, made it possible to meet the objective of improving health safety (reduction in populations of *Listeria monocytogenes* and enterococci, and in the levels of biogenic amines) while maintaining the flavour of farm-produced sausages.

The publication of Good Hygiene Practice guidelines has provided producers with a novel tool and will allow farmers and artisans throughout Europe to manufacture cured meat products that meet the food safety standards stipulated in European Union regulations. The guidelines comprise four sections: the first takes the form of datasheets or "Guidelines" which identify critical points to be monitored throughout the manufacturing chain, and the actions proposed and/or recommended to control them; the second is entitled "For more information", and refers to the Good Practices that must be applied in farm workshops. The third contains examples of control datasheets that will allow producers to trace and improve the critical points encountered, and the fourth contains all regulatory texts and standards. All results from French production workshops have been circulated to the profession through the publication of a special issue of the journal *Viandes et Produits Carnés (Meats and Meat Products)* (2006, volume 25) and via the website:

<http://www.clermont.inra.fr/tradisausage>

From the genome to *in situ* expression in food matrices

In a context of global regulations, the future of fermented foods is more than ever linked to complete mastery of the micro-organisms involved: safety of strains, resistance to technological stress and mastery of organoleptic qualities. The microbial ecosystems associated with fermented products are complex; several species interact between each other and with the matrix. To be understood and mastered, microbial behaviour must be explored directly in a food. The full genomic sequence of the *S. xylosum* C2a strain, finalized in 2007, has already enabled the development of a specific DNA chip designed to study the expression of *S. xylosum* genes in food matrices, alone or in association with other bacteria of technological value, and to highlight the adaptation mechanisms that prevail in each situation.