

TITRES ET TRAVAUX PRESENTES POUR L'OBTENTION DE L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES DE L'UNIVERSITE DE NANTES

HDR présentée par

FRANÇOISE LEROI
cadre de recherche en microbiologie alimentaire
INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DES MERS
- IFREMER DE NANTES -

QUALITE ET SECURITE DES PRODUITS DE LA MER

Soutenu le 2 Mars 2007 devant le jury composé de

M. Jean-Noël Hallet :	Président
Mr Pierre Malle :	rapporteur
Mme Marie-Christine Montel :	rapporteur
Mr Hervé Prévost :	rapporteur
Mr Bernard Picoche :	examineur
Mr Patrick Durand :	examineur

Département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines
IFREMER – Rue de l'Île d'Yeu – BP 21105
44311 Nantes Cedex 03
fleroi@ifremer.fr

SOMMAIRE

CURRICULUM VITAE	3
I. PRESENTATION DU CANDIDAT	4
II. CURSUS UNIVERSITAIRE ET DIPLOMES OBTENUS	4
III. EXPERIENCE PROFESSIONNELLE	5
IV. ACTIVITES D'ENCADREMENT DE JEUNES CHERCHEURS	6
stage post-doctoral	6
co-encadrement de thèse de doctorat	6
participation à l'encadrement de thèse de doctorat	6
stage bac + 5 (ingénieur dernière année, DESS)	7
stage bac + 2, bac + 3 et bac + 4 (BTS, licence, maîtrise)	8
V. PARTICIPATION A DES JURY	8
thèse de doctorat	8
ingénieur et DESS	8
VI. ANIMATION D'EQUIPE DE RECHERCHE	8
VII. FINANCEMENT DES PROJETS DE RECHERCHE	9
coordination de projets de recherche	9
participation à des projets de recherche	9
VIII. VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE	10
Bilan des publications, communications orales et posters	10
publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture	11
publications scientifiques dans des revues nationales à comité de lecture	13
article dans revues spécialisées	13
article dans ouvrage	13
IX. PARTICIPATION A DES COLLOQUES ET CONGRES	14
communications orales en tant que conférencier invité	14
communications orales	14
communication par affiche	16
X. ORGANISATION DE COLLOQUES	18
XI. RELATION INTERNES ET EXTERNES	18
a l'IFREMER	18
au niveau national	19
au niveau européen	20
au niveau international	20
XII. ACTIVITE D'EXPERTISE	21
expertises européennes	21
expertises nationales	21
XIII. ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT	21

SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE	23
I. SYNTHESE DES TRAVAUX REALISES PENDANT MES ETUDES UNIVERSITAIRES	23
I.1 Stage de fin d'étude d'ingénieur agronome de l'ENSAR option Biotechnologie et de DEA de "Génie enzymatique, Microbiologie et Bioconversion" de l'Université de Compiègne (6 mois).	23
I.2 Travail de thèse de doctorat, spécialité "Science des Aliments", de l'université de Nantes (3 ans).	23
II. SYNTHESE DES TRAVAUX REALISES EN TANT QUE CADRE A L'IFREMER	25
II.1 Description des fonctions occupées en qualité de cadre à l'IFREMER	25
II. 2 Résumé des principaux résultats acquis à l'IFREMER	26
II.2.1 Altération du saumon fumé	27
II.2.1.1 Biodiversité de la flore du saumon fumé	27
II.2.1.2 Potentiel d'altération des bactéries du saumon fumé	29
II.2.1.3 Indices de qualité du saumon fumé	30
II.2.1.4 Maîtrise de la qualité du saumon fumé	31
II.2.2 Sécurité sanitaire du saumon fumé	32
II.2.2.1 Cinétiques de croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans les produits fumés	33
II.2.2.2 Effet des paramètres technologiques sur <i>L. monocytogenes</i>	33
II.2.2.3 Biopréservation du saumon fumé	34
PROJET DE RECHERCHE ET PERSPECTIVES	36
I. Microbiologie prévisionnelle	37
I. 1 Incidence de la fumée sur <i>Listeria monocytogenes</i>	39
I.2 Adaptation des flores à la matrice	41
II. Technologies barrières et mécanismes de stress	42
II.1 Biopréservation et mécanismes d'interactions bactériennes	42
II.1.1 Adaptation au froid	43
II.1.2 Mécanismes d'inhibition	43
II.1.3 Prédiction et quantification de l'effet inhibiteur	44
II.1.4 Application aux produits de la mer à l'échelle pilote	45
II.2 Technologies douces de décontamination : la lumière pulsée	45
II.3 Association de barrières	46
III. Qualité et sécurité de la crevette	47
III.1 Qualité des crevettes	48
III.2 Analyse du risque sanitaire	49
III.3 Maîtrise de la qualité et de la sécurité	49
IV. Conclusion	49
V. Références bibliographiques	50

CURRICULUM VITAE

I. PRESENTATION DU CANDIDAT

Françoise LEROI

Née le 09 Mai 1965 à Reims (51)

Nationalité Française

mariée, trois enfants

Adresse personnelle :

18 Rue de la Chevalerie

44300 Nantes

Tel : 02 40 29 81 68

Adresse professionnelle :

IFREMER

Département STAM

Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105

44311 Nantes Cedex 03

Tel : 02 40 37 41 72 – Fax : 02 40 37 40 71

Email : fleroi@ifremer.fr

II. CURSUS UNIVERSITAIRE ET DIPLOMES OBTENUS

1983 : **Baccalauréat série C**, mention Bien

1983-1985 : Classes Préparatoires de Biologie Math-Sup et Math-Spé à Rennes

1985-1988 : Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. Dernière année à l'Institut Supérieur d'Agro-Alimentaire (ISAA), option biotechnologie.
Diplôme d'Ingénieur Agronome de l'ENSAR

1987-1988 : DEA de Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie de l'Université Technologique de Compiègne. **Diplôme d'Etudes Approfondies**

1989-1993 : Ecole Doctorale de Chimie-Biologie, spécialité Sciences des Aliments.
Doctorat de l'Université de Nantes

III. EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

1988 : **Stage de DEA** à la station de technologie des produits végétaux de l'INRA de Guadeloupe : "Métabolisme des acides organiques par les agents microbiens (levures et bactéries) lors de la fermentation rhumière". Compétences acquises : microbiologie classique, cultures en anaérobiose stricte, dosage des acides organiques, des sucres et de l'éthanol par HPLC, dosage des acides gras volatils par CPG.

1989-1993 : **Doctorat** financé par le Ministère de l'Agriculture et réalisé à l'Ecole Nationale des Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaire (ENITIAA) de Nantes : "Interactions entre les bactéries lactiques et les levures isolées du grain de kéfir sucré". Compétences acquises : techniques d'étude des interactions microbiennes, métabolisme microbien, fermentation, biochimie analytique, plans d'expériences.

Depuis 1993 : **Cadre de recherche en microbiologie alimentaire à l'IFREMER de Nantes** (France) dans le département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines (anciennement laboratoire de Génie Alimentaire) dirigé par Jean-Luc Vallet, sur le thème "Qualité et sécurité des produits de la mer". Depuis 1999, activité à 80%.

Mission :

- Développer et pérenniser une activité de recherche en microbiologie au sein du département "Sciences et Techniques Alimentaires Marines" et lui donner un rayonnement national et européen

Responsabilités :

- Au sein de l'IFREMER, responsable de l'équipe de microbiologie (3 personnes + étudiants) et responsable de plusieurs projets ou actions impliquant en moyenne une dizaine de cadres et techniciens (microbiologistes, biochimistes, technologues, analystes sensoriels ...).
- Définition et orientation des axes de recherche
- Recherche de financements (appels d'offres régionaux, nationaux et européens, projets industriels ...)
- Coordinatrice de programmes de recherche nationaux et européens.

Activité de recherche (voir p 25 pour les résultats détaillés):

- Mise en place des protocoles expérimentaux
- Participation à la réalisation des expériences, incluant microbiologie, technologie alimentaire, analyses sensorielles, analyses biochimiques
- Développement de l'outil de biologie moléculaire pour l'aide à la caractérisation des micro-organismes et à l'étude de la biodiversité microbienne
- Généralisation de l'utilisation des traitements d'analyses statistiques dans les études microbiologiques, que ce soit pour planifier les expériences ou pour traiter les données (plans d'expériences, analyses multivariées, microbiologie prévisionnelle)

- Valorisation au travers de publications, colloques, journées pour les industriels, expertise au niveau national et européen (5^{ème} et 6^{ème} PCRD)

IV. ACTIVITES D'ENCADREMENT DE JEUNES CHERCHEURS

stage post-doctoral

- **Murielle Bourrain (1999-2000)** : Etude Moléculaire de la diversité de la flore du saumon fumé. Bourse IFREMER (18 mois). Co-encadrement (50%) avec George Barbier du Laboratoire de Caractérisation des Micro-Organismes Marins (IFREMER Brest) (1 article en cours).
- **Sophie Giacomazzi (2003)** : Optimisation des méthodes d'extraction d'ADN et mise en place de la TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) pour étudier la diversité de la flore du saumon fumé. Bourse IFREMER (12 mois). Co-encadrement (15 %) avec Jean-Jacques Joffraud (IFREMER Nantes) (2 articles).

Co-encadrement de thèse de doctorat

- **Laurence Leblanc (1997-2000)** : Incidence de stress physico-chimiques liés aux processus technologiques de fabrication du saumon fumé sur une bactérie d'altération : *Shewanella putrefaciens*. Thèse de l'école doctorale de Chimie-Biologie, Université de Caen. Co-encadrement (50%) avec Axel Hartke (Université de Caen) (3 articles).
- **Anne Brillet (2001-2005)** : Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fumé. Thèse de l'école doctorale de Chimie Biologie, Université de Nantes. Co-encadrement (50%) avec Marie France Pilet (ENITIAA, Nantes) (2 articles + 2 soumis).
- **Sébastien Matamoros (2004-2007)** : Caractérisation de bactéries lactiques psychotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Etude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation à l'environnement. Thèse de l'école doctorale de Chimie Biologie, Université de Nantes. Co-encadrement (50%) avec Marie France Pilet (ENITIAA, Nantes) (1 article en cours).

Participation à l'encadrement de thèse de doctorat

- **Nadia Le Den (1992-1995)** : Conductance-métrie indirecte : détection de gaz bactériens, application au suivi des paramètres de croissance de *Shewanella putrefaciens*. Thèse du groupe de formation doctorale de Microbiologie, option écologie microbienne, pathologie des micro-organismes, agents infectieux, Université de Paris Sud. Accueil et suivi (80%) pendant 1 an à l'IFREMER, et examinateur de sa thèse.
- **Jacqueline Thurette (1992-1995)** : *Listeria* et saumon fumé, acquisition de données pour la microbiologie prévisionnelle. Thèse de l'Université de Sciences et techniques de Lille, spécialité Sciences de la vie et de la santé, option Microbiologie. Suivi scientifique pendant 2 ans (15%).

- **Frédérique Duffes (1996-1999)** : Efficacité de *Carnobacterium* à inhiber *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé. Identification de deux protéines impliquées dans la résistance de *Listeria monocytogenes* à la divercine V41. Thèse de l'ENSAR, mention Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire. Accueil pendant 4 mois (100%), suivi scientifique pendant 2 ans (15%) et examinateur de sa thèse (3 articles).
- **Margarida Ribeiro Da Silva Neunlist (2001-2004)** : Réponses physiologiques de *Listeria monocytogenes* aux stress : applications particulières aux stress froid, salin et matriciel. Thèse de l'école doctorale de Chimie Biologie, Université de Nantes. Suivi scientifique pendant 8 mois (50%) (1 article).
- **Noura Elmnasser (2003-2006)** : Effet de traitements par la lumière pulsée sur trois micro-organismes d'intérêt en hygiène des aliments : *Listeria monocytogenes*, *Photobacterium phosphoreum* et *Pseudomonas fluorescens*. Collaboration (15%) avec Michel Fédérighi (ENV Nantes) et Nicole Orange (Université de Rouen) (1 article).
- **Emmanuel Jaffres (2006-2008)** : Caractérisation des écosystèmes microbiens complexes en vue de la maîtrise des flores pathogènes et d'altération des produits de la mer. Thèse de l'école doctorale de Chimie Biologie, Université de Nantes. Suivi scientifique (10%) avec Jean-Jacques Joffraud (IFREMER) et Xavier Dousset (ENITIAA).

stage bac + 5 (ingénieur dernière année, DESS)

- **Thérèse Ollier (1994)** : Utilisation de la souche de bactérie lactique *Carnobacterium divergens* V41 productrice de bactériocine pour inhiber les *Listeria* dans le saumon fumé. Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.
- **Céline Fontaine (1996)** : Optimisation de la production de piscicocines par *C. piscicola* V1. Application au saumon fumé. Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.
- **Caroline Roy (1997)** : Caractérisation des composés volatils issus de la dégradation du saumon fumé. Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.
- **Véronique Mahy (1997)** : Caractérisation de *Carnobacterium* isolés de saumon fumé par électrophorèse en champ pulsé. Stage ingénieur 3^{ème} année, Institut Meurice, Bruxelles.
- **Valérie Stohr (1998)** : Profils sensoriels de souches isolées de saumon fumé et ensemencées sur un substrat modèle (saumon fumé stérile). Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.
- **Jérôme Burckel (2000)** : Amélioration de la qualité hygiénique du saumon fumé par des méthodes de biopréservation. Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.
- **Vincent Passard (2001)** : *Listeria monocytogenes* dans la truite fumée. Tests de croissance et inhibition. Stage de DESS d'ingénierie cellulaire et tissulaire, Caen.
- **Mavo Ralazamahaleo (2002)** : Etude de l'état physiologique et de la virulence de *Listeria monocytogenes* en réponse aux stress rencontrés au cours du procédé de fabrication du saumon fumé. Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.

- **Sheng Pang (2005)** : Prédiction de la croissance de *Listeria monocytogenes* en fonction de la concentration en composés phénoliques. Stage ingénieur ENITIAA 3^{ème} année, Nantes.

stage bac + 2, bac + 3 et bac + 4 (BTS, licence, maîtrise)

Encadrement d'un ou parfois deux stagiaires chaque année depuis 12 ans.

V. PARTICIPATION A DES JURYS

thèse de doctorat

- **Nadia Le Den (1995)** : Conductance-métrie indirecte : détection de gaz bactériens, application au suivi des paramètres de croissance de *Shewanella putrefaciens*. Thèse du groupe de formation doctorale de Microbiologie, option écologie microbienne, pathologie des micro-organismes, agents infectieux, Université de Paris Sud. Examineur.
- **Frédérique Duffes (1999)** : Efficacité de *Carnobacterium* à inhiber *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé. Identification de deux protéines impliquées dans la résistance de *Listeria monocytogenes* à la divéricine V41. Thèse de l'ENSAR, mention Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire. Examineur.
- **Laurence Leblanc (2000)** : Incidence de stress physico-chimiques liés aux processus technologiques de fabrication du saumon fumé sur une bactérie d'altération : *Shewanella putrefaciens*. Thèse de l'école doctorale de Chimie-Biologie, Université de Caen. Examineur.
- **Anne Brillet (2005)** : Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fumé. Thèse de l'école doctorale de Chimie Biologie, Université de Nantes. Examineur.
- **Ysabelle Adolphe (2006)** : Etude du fonctionnement du système lactoperoxydase et validation de son efficacité antibactérienne vis à vis de flores du poisson. Ecole doctorale RP2E "Ressources produits procédés environnement".

Ingénieur et DESS

Membre du jury des neuf étudiants ingénieurs et DESS encadrés et cités ci-dessus.

VI. ANIMATION D'EQUIPE DE RECHERCHE

- **Depuis 1994** : Au sein de l'IFREMER, responsable de l'équipe de microbiologie (3 personnes + étudiants)
- **1994 à 2004** : Responsable du projet de laboratoire "fumage des produits marins", impliquant 9 cadres (R. Baron, M. Cardinal, J. Cornet, J.J. Joffraud, C. Knockaert, F. Leroi, M. Mastail, T. Serot et J.L. Vallet) et 4 techniciens (J.C. Bardin, F. Chevalier, C. Donay-Moreno et G. Desportes). Ce projet met en œuvre différentes actions concernant à la fois les aspects technologiques (optimisation et développement des procédés de fumage), biochimiques (composition de la

fumée, composés volatils etc...), sensoriels (jury permanent entraîné à noter la qualité des produits marins fumés) et microbiologiques (qualité et sécurité).

- **Depuis 2005** : restructuration de l'IFREMER. Responsable de l'action HURDLETECH impliquant une dizaine de personnes de l'IFREMER plus cinq partenaires européens. Cette action correspond à un projet du projet intégré européen SEAFOODplus. Il porte sur le développement des technologies barrières, incluant des techniques innovantes de décontamination, pour garantir la qualité et la sécurité microbiologiques des produits marins.

VII. FINANCEMENT DES PROJETS DE RECHERCHE

coordination de projets de recherche

- **2001-2003** : Coordinateur du projet Aliment Qualité Sécurité "Maîtrise du risque *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé par utilisation raisonnée de souches bio-protectrices de *Carnobacterium* spp.", impliquant 4 partenaires : IFREMER, ENITIAA, ASEPT et CITPPM.
- **2002-2003** : Responsable d'un projet industriel 02/5210817/YF sur la "Prévention de *Listeria* et de flores altérantes dans le saumon fumé" (confidentiel).
- **2004-2008** : Coordinateur du projet HURDLETECH (5 ans): Projet du Projet Intégré SEAFOODplus n° FOOD-CT-2004-506359 du 6ème PCRD (80 partenaires). Hurdle technology, including minimal processing, to ensure quality and safety of convenience seafood. Six partenaires (RIVO en Hollande, NIFA en Norvège, IFL en Islande, AZTI en Espagne, ENITIAA et IFREMER en France).

participation à des projets de recherche

- **1990-1994** : Participation au projet Européen FAR-CEE UP-2514 "application of lactic acid fermentation to the preservation of fish and fish products" impliquant 3 partenaires : ENITIAA, Université de Loughborough (UK) et IFREMER.
- **1994-1998** : Mise en place et responsable pour l'IFREMER du programme régional VANAM (valorisation alimentaire et non alimentaire des macromolécules): étude de stress physico-chimiques liés au procédé de fabrication du saumon fumé sur des bactéries d'altération.
- **1996-1999** : Participation au projet Européen FAIR CT95-1101 "Interactions between raw material characteristic and smoking process on quality of smoked salmon" impliquant 6 partenaires : CSTC (Espagne), ICETECH (Islande), IMR, INR et AKVAFORSK (Norvège).
- **1996-1999** : Mise en place et responsable pour l'IFREMER du projet Européen FAIR PL95-1207 "Spoilage and safety of cold-smoked salmon" impliquant 9 partenaires: DIFRES (Danemark), RIVO (Hollande), IFL (Islande), Université de Cork (Irlande), ESB (Portugal), LFRA (Angleterre), ASEPT et ENITIAA (France).
- **2000-2003** : Participation au projet Européen QLK1-2000-01575 "Improved quality of smoked salmon for the European consumer" impliquant 4 partenaires : ICETECH (Islande), IMR (Norvège) et ADRIAN (Nantes).
- **2003-2004** : Mise en place et participation au projet financé par la région Nord Pas de Calais n° 03 1300 13 "Etude de faisabilité de l'inhibition de *Listeria*

monocytogenes dans le saumon mariné à sec par utilisation de bactéries lactiques sélectionnées" impliquant 4 partenaires : CEVPM, AFSSA Boulognes, ENITIAA et IFREMER.

- **2004-2006** : Participation au projet OFIMER "Application du chilling au saumon fumé : incidence sur le développement de *Listeria monocytogenes*, de la flore annexe et sur les qualités sensorielles" impliquant 4 partenaires : AFSSA Paris, CITPPM, ENITIAA et IFREMER.

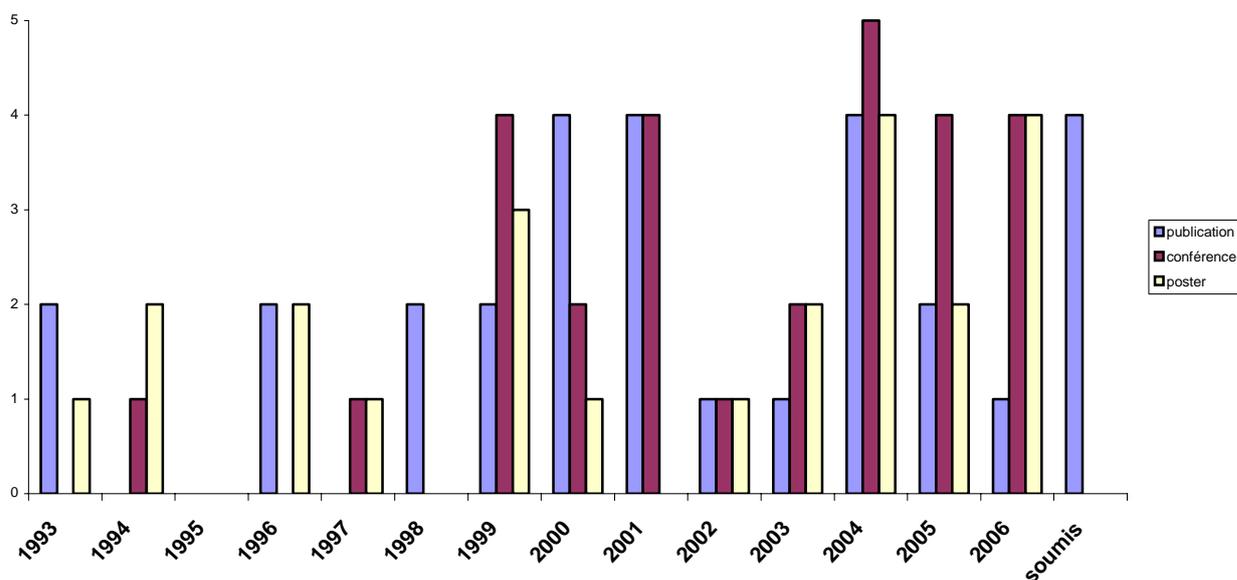
VIII. VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Bilan des publications, communications orales et posters

Le tableau ci-dessous résume le nombre d'articles et de conférences au cours de ma carrière.

Typologie	nombre
Publication dans des revues internationales à comité de lecture	25 (+ 4 soumises)
Publication dans des revues nationales à comité de lecture	2
Article dans ouvrage	2
Communication orale en tant que conférencier invité	4
Communication orale	24
Communication par affiche	23
Organisation de colloque	3

La figure ci-dessous montre l'évolution de la production scientifique au cours du temps.



publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture

- **Leroi, F. and M. Pidoux (1993)**. Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 48-53 (IF : 2.127).
- **Leroi, F. and M. Pidoux (1993)**. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 54-60 (IF : 2.127).
- **Leroi, F. and P. Courcoux (1996)**. Influence of pH, temperature and initial yeast : bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 138-146 (IF : 2.127).
- **Leroi, F., N. Arbey, J.J. Joffraud and F. Chevalier (1996)**. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf life of vacuum-packed cold smoked salmon. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 497-504 (IF : 0.719).
- **Joffraud, J.J., F. Leroi and F. Chevalier (1998)**. Development of a sterile cold-smoked fish model. *Journal of Applied Bacteriology*, 85, 991-998 (IF : 2.127).
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal (1998)**. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 111-121 (IF : 2.499).
- **Duffes, F., C. Corre, F. Leroi, X. Dousset and P. Boyaval (1999)**. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced and semi-purified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4°C and 8°C. *Journal of Food Protection*, 62, 12, 1394-1403 (IF : 1.687).
- **Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval and X. Dousset (1999)**. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold-smoked fish system stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 33-42 (IF : 2.499).
- **Duffes, F., F. Leroi, X. Dousset and P. Boyaval (2000)**. Use of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* strain, isolated from fish, to control *Listeria monocytogenes* development in vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4°C. *Science des Aliments*, 20, 153-158 (IF : 0.229).
- **Leblanc, L., F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (2000)**. Do stresses encountered during the smoked salmon process influence the survival of the spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens* ? *Letters in Applied Microbiology*, 30, 437-442 (IF : 1.440).
- **Leroi, F., J.J. Joffraud and F. Chevalier (2000)**. Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5°C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*, 63, 4, 502-508 (IF : 1.687).
- **Leroi, F. and J.J. Joffraud (2000)**. Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. *Journal of Food Protection*, 63, 9, 1222-1227 (IF : 1.687).

- **Joffraud, J.J., F. Leroi, C. Roy and J.L. Berdagué (2001).** Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the cold-smoked salmon flora. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 175-184 (IF : 2.499).
- **Leblanc, L., K. Gouffi, F. Leroi, A. Hartke, C. Blanco, Y. Auffray and V. Pichereau (2001).** Uptake of choline from salmon flesh and its conversion to glycine betaine in response to salt stress in *Shewanella putrefaciens*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 93-103 (IF : 2.499).
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal (2001).** Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 578-587 (IF : 2.127).
- **Stohr, V., J.J. Joffraud., M. Cardinal and F. Leroi (2001).** Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International*, 34, 797-806 (IF : 1.256).
- **Leblanc, L., C. Leboeuf, F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (2003).** Comparison between NaCl tolerance response and acclimation to cold temperature in *Shewanella putrefaciens*. *Current Microbiology*, 46, 3, 157-162 (IF : 1.059).
- **Brillet, A., M.F. Pilet, P. Prévost, A. Bouttefroy and F. Leroi (2004).** Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 97 1029-1037 (IF : 2.127).
- **Cardinal, M., H. Gunnlaugsdottir, M. Bjoernevik , A. Ouisse, J.L. Vallet and F. Leroi (2004).** Sensory characteristics of cold- smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International*, 37, 181-193 (IF : 1.256).
- **Giacomazzi, S., F. Leroi, C. L'Henaff and J.J. Joffraud (2004).** RpoB-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis : a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 2, 130-134 (IF : 1.440).
- **Richard, C., F. Leroi, A. Brillet, C. Rachman, N. Connil., D. Drider, M.F. Pilet, B. Onno, X. Dousset and H. Prévost (2004).** Control development of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon: interest of the biopreservation by lactic bacteria. *Lait*, 84, 1-2, 135-144 (IF : 0.795).
- **Giacomazzi, S., F. Leroi and J.J. Joffraud (2005).** Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied microbiology*, 98, 5, 1230-1238 (IF : 2.127).
- **Ribeiro Neunlist, M., M. Ralazamahaleo, J. M. Cappelier, V. Besnard, M. Federighi and F. Leroi (2005).** Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection*, 68,1, 85-91 (IF : 1.687).
- **Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prévost, and F. Leroi (2005).** Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 309-324 (IF : 2.499).

- **Joffraud, J.J., M. Cardinal, J. Cornet, J.S. Chasles, S. Léon and F. Leroi (2006).** Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 1, 51-61. (IF : 2.499).
- **Brillet, A., M.F. Pilet, S. Horakova, P. Courcoux, H. Prévost and F. Leroi (submitted).** Optimization of growth and bacteriocin production of *Carnobacterium divergens* V41, an interesting bacteriocin-producing strain for the biopreservation of cold-smoked fish, by batch fermentation in a culture medium deprived of protein of animal origin. *Journal of Food Protection* (IF : 1.687).
- **Brillet, A., C. Blanchet-Chevrollier, H. Prévost, F. Leroi and M.F. Pilet (submitted).** Isolation and characterization of a stable tyrosine decarboxylaseless mutant of a bacteriocin-producing *Carnobacterium divergens* strain and its application in cold-smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology* (IF : 3.818).
- **Matamoros, S., M.F. Pilet, F. Gigout, H. Prévost and F. Leroi (submitted)** Selection and evaluation of seafood-born acid lactic bacteria as protective cultures for the biopreservation of seafood products. *International Journal of Food Microbiology*.
- **Guilbaud, M., I. Chafsey, M.F. Pilet, F. Leroi, H. Prévost, M. Hébraud and X. Dousset (submitted).** The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes* EGDE's behaviour. *Journal of applied Microbiology*.
- **Bourrain, M., H. Agogué, F. Leroi, J.J. Joffraud, F. Chevalier and G. Barbier (finalisation de la rédaction).** Bacterial population changes during vacuum storage of cold-smoked salmon: The molecular approach offers new advances to identify spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* (IF : 2.449).

publications scientifiques dans des revues nationales à comité de lecture

- **Leroi, F. (2002).** La microbiologie de saumon fumé à froid : aspects hygiéniques et qualité. *Revue générale du froid*, 1028, 35-40.
- **Elmnasser, N., M. Ritz-Bricaud, S. Guillou, F. Leroi, N. Orange, A. Bakhrouf et M. Federighi (2006).** Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid : Implication en sécurité des aliments. *Revue de Médecine vétérinaire*. 157, 2, 92-101

article dans revues spécialisées

- **Tournay, B. and F. Leroi (2005).** EU project addresses convenience seafood. *Fish farming international*, Novembre, p 16.

article dans ouvrage

- **Hallé, C., F. Leroi, X. Dousset et M. Pidoux (1994).** Les kéfirs : des associations bactéries / levures. In "Bactéries lactiques", Vol 2, chapitre 6, pp169-182, H. de Roissart et F.M. Luquet coordonnateurs, Loriga, Uriage, France.

- **Leroi, F. (2006).** Bactéries lactiques et applications alimentaires. partie 2 : les produits de la mer. In "Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications Industrielles des bactéries lactiques" Djamel Drider et Hervé Prévost coordonateurs, soumis.

IX. PARTICIPATION A DES COLLOQUES ET CONGRES

Communications orales en tant que conférencier invité

- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal, V. Stohr, J.L. Berdagué et J.L. Vallet (2001).** Identification of spoilage micro-organisms and research of quality indices for cold-smoked salmon. 46ème conférence de l'AFTC, 26-31 août, Rimouski, Canada. **Publication in "Seafood quality and safety", Shahidi F. and Simpson B. K. ed, pp337-354, avec comité de lecture.**
- **Leroi, F. (2002).** Seafood safety : the microbial aspects and next 5 years perspectives. Conférence d'ouverture du 6ème PCRD, 13 novembre, Bruxelles.
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal, J.L. Berdagué et J.L. Vallet (2004).** Maîtrise de la qualité et de la sécurité des produits marins fumés par une stratégie de biopréservation. Colloque Bioconservation des produits marins, 3-7 Mai, Québec. **Publication dans les actes du colloque.**
- **Leroi, F. (2006).** Promising hurdle technologies to minimise the survival and growth of pathogens and spoilage bacteria in seafood during processing. 3^{ème} conférence plénière du SEAFOODplus, 30-31 Mai, Tromsø, Norvège.

Communications orales

- **Leroi, F. (1994).** Application des bactéries lactiques à la conservation du poisson. Colloque "Biotechnologies appliquées aux IAA", Bilan du contrat de plan état région 89-93, 28 Janvier, Nantes, France.
- **Leroi, F., J.J. Joffraud and F. Chevalier, M. Cardinal, J. Cornet and J.L. Vallet (1997).** Effect of salting and smoking on the microbiological, chemical and sensorial quality of cold-smoked salmon. 27th WEFTA meeting, Madrid, Espagne. **Publication dans les actes du colloque.**
- **Leblanc, L., F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (1999).** Analyses of stress response of *Shewanella putrefaciens* towards treatments encountered during the process of fabrication of smoked salmon. Symposium international sur le stress microbien, 14-16 juin, Quimper.
- **Leblanc, L., F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (1999).** Does the process of fabrication of smoked salmon influence the survival of a spoiling microorganism, *Shewanella putrefaciens* ? 29th WEFTA meeting 10-14 october, Thessaloniki, Greece. **Publication in "Proceedings of the 29th WEFTA meeting", Georgakis Ed., pp 116-123, avec comité de lecture.**
- **Leroi, F. et J.J. Joffraud (1999).** Altération et hygiène du poisson fumé. Résultats du programme FAIR CT95-1207. Journée d'information CITPPM (confédération des industriels de transformation des produits de la pêche maritime), 30 juin, Nantes.

- **Leroi, F., J.J. Joffraud, V. Stohr, C. Roy, M. Cardinal and J.L. Berdagué (1999)**. Characterization of the spoilage microflora of refrigerated cold-smoked salmon. 29th WEFTA meeting 10-14 october, Thessaloniki, Greece. **Publication in "Proceedings of the 29th WEFTA meeting", Georgakis Ed., pp 116-123, avec comité de lecture.**
- **Bourrain, M., H. Agogué, F. Leroi, J.J. Joffraud, F. Chevalier et G. Barbier (2000)**. Bacterial population shifts during vacuum storage of cold-smoked salmon. Application of a molecular approach to describe communities of facultative anaerobes. Colloque " Microbiologie anaérobie " de la Société Française de Microbiologie, 5-6 avril, Lyon.
- **Bourrain, M., H. Agogué, F. Leroi, J.J. Joffraud, F. Chevalier et G. Barbier (2000)**. Comparaison des approches culturale et moléculaire pour le suivi de la flore bactérienne du saumon fumé au cours du stockage sous vide à 5°C. Colloque " Microbiologie en Finistère ", 7 juin, Quimper.
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal, J.L. Berdagué et J.L. Vallet (2001)**. Caractérisation de la flore d'altération du saumon fumé et recherche d'indices de qualité. Bordeaux Aquaculture, 21 mars. **Publication dans les actes du colloque.**
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal (2001)**. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. 31ème conférence du WEFTA, 27-31 mai, Espoo, Finlande. **Publication dans les actes du colloque. Chair-woman d'une session.**
- **Leroi, F. (2001)**. Maîtrise du risque *L. monocytogenes* dans le saumon fumé par utilisation raisonnée de souches bio-protectrices de *Carnobacterium* spp. Caractérisation de la flore d'altération du saumon fumé et recherche d'indices de qualité. Journée d'information CITPPM, 19 septembre, Nantes.
- **Leroi, F. (2003)**. Maîtrise du risque *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé par utilisation raisonnée de souches bio-protectrices de *Carnobacterium* spp. Conférence à la DGAL, Paris.
- **Leroi, F. A. Brillet, M.F. Pilet, J.J. Joffraud and H. Prévost (2003)**. Biopreservation of cold-smoked salmon by the use of selected *carnobacterium* strains. TAFT meeting (conjoint AFTC and WEFTA), 10-14 June, Reyckjavick, Islande. **Publication dans les actes du colloque.**
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal, J.L. Berdagué et J.L. Vallet (2004)**. Caractérisation de la flore d'altération du saumon fumé et recherche d'indices de qualité. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, 10-12 Mai.
- **Pilet, M.F, Brillet A., Connil N., Leroi F, Dousset X. et Prévost H. (2004)**. Altération des produits de la mer par production microbienne d'amines biogènes. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, 10-12 Mai.
- **Leroi, F., M. Catherine and L. Han Ching (2004)**. The microbial aspect of safety in fishery products. International meeting on quality and security of fishery products. Vigo (Espagne), 19-20 Avril.
- **Brillet, A., S. Matamoros, C. Blanchet-Chevrollier, F. Leroi F., H. Prévost et M.F. Pilet (2004)**. Sélection de souches de *Carnobactérium* non productrices de

tyramine en vue de leur utilisation pour la biopréservation du saumon fumé. 13ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Nantes, 8-10 septembre.

- **Matamoros, S., M.F. Pilet, H. Prévost and F. Leroi (2005)**. Selection of psychrotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products. 35th WEFTA meeting, Hanvers, Belgique, 18-22 Septembre. **Publication dans les actes du colloque, avec comité de lecture.** In : Seafood from fish to dish, quality, safety and processing of wild and farmed fish. Edited by J.B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø, J. Oehlenschläger. Wageningen Academic Publishers. Pp. 395-402. **Chair-woman d'une section.**
- **Pilet, M.F., A. Brillet, S. Matamoros, C. Blanchet-Chevrollier, F. Leroi and H. Prévost (2005)**. Selection of non-tyramine producing *Carnobacterium* strains for the biopreservation of cold smoked salmon. 35th WEFTA meeting, Hanvers, Belgique, 18-22 Septembre. **Publication dans les actes du colloque, avec comité de lecture.** In : Seafood from fish to dish, quality, safety and processing of wild and farmed fish. Edited by J.B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø, J. Oehlenschläger. Wageningen Academic Publishers. Pp. 403-402.
- **Leroi, F. (2005)**. Comment devenir expert européen, que fait-on, que nous apporte le fait d'être expert ? Colloque "Europe de la recherche et de l'innovation", Le Mans, 3-4 Octobre 2005.
- **Leroi, F. (2005)**. Maîtrise de la qualité des produits de la mer semi-préservés. Colloque "Des bons aliments, pourquoi, comment ?" PONAN, Nantes, 10 Novembre 2005.
- **Pilet, M.F., S. Matamoros, A. Brillet, H. Prévost, X. Dousset, J.J. Joffraud and F. Leroi (2006)**. Biopreservation, emerging and hurdle technologies for food microbes control. Colloque Food Micro, The 20th international ICFMH symposium, 29 Août-2 Septembre, Bologne, Italie.
- **Leroi F (2006)**. Promising hurdle technologies to minimise the survival and growth of pathogens and spoilage bacteria in seafood during processing. SEAFOODplus, annual meeting, 29-31 Mai 2006, Tromsø, Norvège
- **Matamoros, S., M.F. Pilet, H. Prévost and F. Leroi (2006)**. Evaluation of psychrotrophic lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of seafood products. TAFT meeting, 29 Oct-02 Nov, Québec, Canada.

Communication par affiche

- **Leroi, F. (1993)**. Etude des interactions entre levures et bactéries isolées du grain de kéfir sucré. Colloque Microbiologie Alimentaire, Dijon, 9-10 Mars.
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, T. Ollier, X. Dousset et J.F. Mescle (1994)**. Effect of lactic acid starters for extending the shelf-life of vacuum packed cold smoke salmon. Colloque WEFTA, 25-29 Septembre, Nantes, France.
- **Arbey, N., J.J. Joffraud, F. Chevalier, F. Leroi, M. Cardinal et J. Cornet (1994)**. Application des bactéries lactiques à la préservation des produits de la mer. Colloque Microbiologie Alimentaire, Dijon, 9-10 Mars.

- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal, J. Cornet and J.L. Vallet (1996)**. Effect of salting and smoking on the microbiological, chemical and sensorial quality of cold-smoked salmon. Symposium of Microbial Food Spoilage, October 15-16th, Technical University of Lingby, Denmark.
- **Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier, M. Cardinal, J. Cornet and J.L. Vallet (1996)**. Effet du salage et du fumage sur l'évolution microbiologique, chimique et sensorielle du saumon fumé. Colloque GIS régional VANAM, 1er Oct., Nantes.
- **Leroi, F. (1997)**. Effect of salting and smoking on the microbiological, chemical and sensorial quality of cold-smoked salmon. Colloque "la microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés", 16-18 Juin, Quimper.
- **Leblanc, L., F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (1999)**. Incidence du processus de fabrication du saumon fumé sur une bactérie d'altération : *Shewanella putrefaciens*. Journées de clôture du programme régional VANAM, 19-20 octobre, Nantes, France.
- **Leblanc, L., K. Gouffi, F. Leroi, A. Hartke, C. Blanco, Y. Auffray and V. Pichereau (1999)**. Osmotic adaptation of the smoked salmon spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens*. Journées de clôture du programme régional VANAM, 19-20 octobre, Nantes, France.
- **Leroi, F. et J.F. Mescle (1999)**. Comment les micro-organismes répondent-ils aux stress subis dans l'agro-industrie ? Journées de clôture du programme régional VANAM, 19-20 octobre, Nantes, France.
- **Joffraud, J.J., F. Leroi, C. Roy and J.L. Berdagué (2000)**. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from cold-smoked salmon flora. ISIAM IV th International Symposium on the Interface between Analytical Chemistry and Microbiology. - 4 –7 juin, Trégastel – Côtes d'Armor, France.
- **Leroi, F. (2002)**. Control of microbiological hazards in cold-smoked salmon. Seafood, Bruxelles, 21-25 avril.
- **Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prévost et F. Leroi (2003)**. Biodiversité des interactions entre *Carnobacterium* et *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé. Colloque Club des Bactéries Lactiques, Aurillac, 19-21 Mai.
- **Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prévost et F. Leroi (2003)**. Effet de l'ensemencement de différentes souches de *carnobacterium* sur les caractéristiques organoleptiques et les flores endogènes du saumon fume. Colloque Club des Bactéries Lactiques, Aurillac, 19-21 Mai.
- **Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prévost et F. Leroi (2004)**. Effet de l'ensemencement de différentes souches de *carnobacterium* sur les caractéristiques organoleptiques et les flores endogènes du saumon fumé. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, 10-12 Mai.
- **Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prévost, J. Cornet et F. Leroi (2004)**. Quality of cold-smoked salmon inoculated by *Carnobacterium* spp. selected for the inhibition of *Listeria monocytogenes*. Colloque Food Factory, Vannes.
- **Leroi, F., F. Chevalier and J.J. Joffraud (2004)**. Hurdle technology including minimal processing to ensure quality and safety of convenience seafood. Réunion plénière du SEAFOODplus. Copenhague, 4-6 Octobre.

- **Leroi, F., F. Chevalier and J.J. Joffraud (2004).** Biopreservation. Réunion plénière du SEAFOODplus. Copenhague, 4-6 Octobre.
- **Matamoros, S., M.F. Pilet, H. Prévost and F. Leroi (2005).** Selection of psychrotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products. 8th symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond-aan-Zee, Hollande, 28 Août au 1er Septembre.
- **Brillet, A., S. Matamoros, C. Blanchet-Chevrollier, F. Leroi, H. Prévost and M.F. Pilet (2005).** Selection of non-tyramine producing *carnobacterium* strains for the biopreservation of cold-smoked salmon. 31th WEFTA meeting, Anvers, Belgique, 18-22 Octobre.
- **Matamoros, S., F. Leroi, H. Prévost and M.F. Pilet (2006).** Characterization of psychrophilic lactic acid bacteria for the biopreservation of seafood products. Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 17-19 Mai, Jouy-en-Josas, France et 1^{er} colloque Peptides Antimicrobiens, 21-23 Juin, Nantes, France.
- **Leroi, F., H. Prévost, S. Matamoros, X. Dousset, J.J. Joffraud and M.F. Pilet (2006).** Biopreservation of lightly preserved seafood products : strategies and perspectives. Colloque IUFoST, 17-21 Septembre, Nantes, France.
- **Baron, R., M. Cardinal, J. Cornet, F. Gigout, C. Knockaert and F. Leroi (2006).** Corona discharge as a way to improve drying and smoking of fish. Colloque IUFoST, 17-21 Septembre, Nantes, France.
- **Baron, R., M. Cardinal, J. Cornet, F. Gigout, and F. Leroi (2006).** Electrohydrodynamic (EHD) drying of Fish. TAFT meeting, 29 Oct-02 Nov, Québec, Canada.

X. ORGANISATION DE COLLOQUES

Leroi, F. (2005). Membre du comité scientifique du 35th colloque du WEFTA, 18-22 Septembre, Hanvers, Belgique.

Leroi, F. (2006). Membre du comité scientifique du 3^{ème} colloque conjoint TAFT (Atlantic Fisheries Technology Conference) et WEFTA, 29 Octobre - 1^{er} Novembre, Québec, Canada.

Leroi, F. (2007). Membre du comité d'organisation du 7^{ème} congrès de la SFM, 30 Mai-1^{er} Juin, Nantes, France.

XI. RELATION INTERNES ET EXTERNES

A I'IFREMER

- j'entretiens des collaborations scientifiques avec le **Laboratoire de Caractérisation des Microorganismes Marins** (nouvellement **Laboratoire Microbiologie des Environnements Extrêmes**) de Brest. Nous avons, conjointement avec ce laboratoire, conduit un travail post doctoral (Murielle Bourrain, 1999). Depuis, les orientations du laboratoire ont été recentrées sur les flores extrémophiles uniquement, mais nous gardons des contacts car les techniques de biologie moléculaire développées à Brest sont applicables à nos

micro-organismes. De la même façon, nous échangeons avec le personnel des départements de **Sciences et Technologie Marines et Biotechnologie Marine** qui développent des méthodes moléculaires similaires aux nôtres pour caractériser les vertébrés marins et les micro-algues.

J'entretiens également des contacts avec le **laboratoire d' Etudes Technico-Réglementaires** (nouvellement Département STAM) pour les aspects réglementaires et pour la **rédaction d'articles pour BIBLIOMER** (revue bibliographique diffusée auprès des industriels francophones).

Au travers de ma **participation au jury d'analyse sensorielle** (2 séances/semaine), je participe à plusieurs projets IFREMER.

Au niveau national

- j'entretiens d'étroites collaborations avec le **Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle de l'ENITIAA**. Ce laboratoire est expert sur la production, la purification et la caractérisation de peptides à activité anti-bactérienne. Il développe également des outils génétiques adaptés à *Carnobacterium* pour l'identification moléculaire et la manipulation génétique de ce micro-organisme. Notre collaboration se traduit par de nombreux projets contractualisés (programmes européens FAR UP 2574 , FAIR CT95-1202 et SEAFOODplus FOOD-CT-2004-506359 ; programmes français AQS Biopréservation et PAO Imibiomer) et le co-encadrement de stagiaires et de thésards (M.F. Pilet, A. Métivier, F. Duffes, A. Brillet, S. Matamoros).
- J'ai également initié une collaboration avec l'unité **Hygiène et Qualité des Aliments de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes**, avec une étude sur la physiologie de *L. monocytogenes*. Cette collaboration va être poursuivie sur des aspects décontamination par lumière pulsée, en collaboration avec **l'université de Rouen**.
- Pour les aspects de stress bactériens, nous avons collaboré avec le **Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement de la faculté de Caen** (thèse de Laurence Leblanc, 1997-2000). Cette collaboration est maintenant occasionnelle.
- Nous avons beaucoup collaboré avec le **Laboratoire des Saveurs de l'INRA de Theix**. Ayant maintenant développé nos propres outils d'analyses biochimiques, nous collaborons plus occasionnellement.
- J'ai également développé une collaboration très suivie avec les **industriels** (fumeurs de poisson, marayeurs...), aux travers de contrats de recherche spécifiques, mais aussi avec la **Confédération des Industries de Transformation des Produits de la Pêche Maritime (CITPPM)**. Cette collaboration se traduit par des études cofinancées et des journées d'information destinées aux industriels.
- En ce qui concerne la valorisation, une partie des résultats de nos recherches est transférée au **CEVPM** de Boulogne (centre technique IFREMER) avec lequel nous avons des projets communs.
- Enfin, je suis membre du **Club des Bactéries Lactiques** et de la **Société Française de Microbiologie**.

Au niveau européen

Les équipes qui travaillent spécifiquement sur la microbiologie des produits de la mer sont peu nombreuses (le plus souvent, une par pays). Dès mon arrivée à l'IFREMER, j'ai développé des relations avec les principaux interlocuteurs européens.

- En 1995, ces contacts se sont concrétisés par un projet européen commun FAIR PL95-1207 "Spoilage and safety of cold-smoked salmon" (1995-1998) dans lequel j'ai travaillé avec le **Danish Institute for Fisheries Research (DIFRES)** (Danemark), le **Netherlands Institute for Fisheries Research (RIVO)** (Hollande), l'**Islandic Fisheries Laboratory (IFL)** (Islande), l'**Université de Cork** (Irlande), l'**Ecole Supérieure de Biotechnologie (ESB)** (Portugal) et le **Leatherhead Food Research Association (LFRA)** (Angleterre).
- Je suis à l'origine d'une relation étroite avec le **DIFRES (Danemark), qui est le laboratoire leader en ce qui concerne la microbiologie des produits de la mer** (nombreux sont les travaux et expertises internationales sur le sujet émanant de leur laboratoire). J'ai particulièrement collaboré avec le **Dr Paw Dalgaard** sur les problèmes d'altération dans le saumon fumé, lors du projet européen FAIR PL95-1207. J'ai poursuivi cette relation pour travailler sur les pathogènes et la biopréservation, avec les Drs Dalgaard et Gram (j'ai notamment proposé un projet Européen sur le sujet, en tant que coordonnateur, projet non retenu dans le 5ème PCRD). Je travaille pour continuer nos collaborations (le Dr Dalgaard a été rapporteur de la thèse de Melle Brillat ; nous avons évoqué les possibilités de projets communs dans le cadre du 7ème PCRD).
- Mes contacts étroits avec les membres du **WEFTA** (West European Fish Technologist Association) m'ont conduit à proposer et à coordonner le projet **HURDLETECH** du Projet Intégré **SEAFOODplus (2003-2008)**, dans lequel je travaille sur les barrières technologiques, la biopréservation et la lumière pulsée avec le **Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Ltd (NIFA)** (Norvège), **RIVO** (Hollande), **Investigacion Alimentaria (AZTI)** (Espagne), **IFL** (Islande) et **ENITIAA** (France).
- Enfin, je fais partie du groupe de travail "microbiologie" du **WEFTA** qui se réunit chaque année et je participe régulièrement aux colloques annuels de cette association.

Au niveau international

- l'IFREMER a une convention avec le MAPAQ (**Ministère de l'Agriculture Canadien**). Dans ce cadre, je collabore plus particulièrement avec le **Centre Technologique des Produits Aquatiques** de Gaspé (Michel Desbien) et l'**Université Laval** à Québec (Pr Ismail Fliss). J'ai été invitée à deux reprises à faire des conférences au Canada, et les Canadiens nous ont rendu visite deux fois. Nous avons déposé au Québec un projet de recherche commun qui nous permettrait d'accueillir un thésard canadien. Ce projet est en cours d'évaluation au CRSNG.

XII. ACTIVITE D'EXPERTISE

Expertises européennes

- **Leroi, F. (1999).** 5^{ème} PCRD, Evaluation des programmes européens. Shared cost RTD actions. 13-17 Décembre, Bruxelles.
- **Leroi, F. (2001).** 5^{ème} PCRD. Experte pour la commission européenne, mesures d'accompagnement. 2-6 juillet, Bruxelles.
- **Leroi, F. (2002).** 5^{ème} PCRD. Marie Curie training Fellowship. Expertise européenne. Bruxelles, 10-14 juin.
- **Leroi, F. (2003).** 6^{ème} PCRD. Mesures d'accompagnement pour les pays candidats. Expertise européenne, Bruxelles, 15-17 Septembre.
- **Leroi, F. (2004).** Expertise Européenne des projets du "Cooperative Research Programme". Bruxelles, 16-21 Février.
- **Leroi, F. (2004).** Expertise Européenne des projets du "Collective Research Programme". Bruxelles, 11-15 Octobre.
- **Leroi, F. (2004).** Expertise Européenne des projets du "Cooperative Research Programme". Bruxelles, 13-17 Décembre.
- **Leroi, F. (2005).** Expertise Européenne des projets intégrés et des réseaux d'excellence. Bruxelles, 14-18 Décembre.

Expertises nationales

- Expertises pour différents appels d'offres nationaux (OFIMER, AQS ...).
- Révision du Décret de 1979 sur les critères microbiologiques des aliments. Participation aux groupes de travail sur les produits de la pêche et coquillages (2002).
- Reviewer de nombreux articles dans journaux internationaux à comité de lecture.

XIII. ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT

- **Leroi, F. (1990-1991)** : Travaux pratiques de Génie Alimentaire pour élèves ingénieurs 2^{ème} année ENITIAA (20h/an).
- **Leroi, F. (1992-1993)** : Interactions microbiennes. Cours pour élèves ingénieurs 3^{ème} année ENITIAA et pour Maîtrise à la faculté de Nantes (2*2h/an).
- **Leroi, F. (1993)** : Travaux pratiques de microbiologie alimentaire, CNAM (20h).
- **Vallet, J.L. et F. Leroi (1997).** Action de formation d'agents des services vétérinaires sur la transformation des produits de la mer, aspects technologiques et microbiologiques. Contrat n° 97/5 211 258 F, 11-27 Novembre, Nouméa, Nouvelle Calédonie (20 h).
- **Leroi, F. et J.J. Joffraud (1999).** Qualité et sécurité des poissons marins. Formation ADRIA, Novembre (8 h).

- **Leroi, F. (1998).** Microbiologie alimentaire et d'HACCP. Le froid et les produits de la mer, cours organisé par l'Association nationale du froid et l'Institut international du froid, pour des professionnels, Agadir, 15-17 octobre (5 h).
- **Leroi, F. (1998-2005).** Contrôle de la qualité des produits marins. DESS Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Université de Caen (2 h/an).

SYNTHESE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Lors de mes études universitaires, mes travaux de recherche ont essentiellement porté sur les fermentations (rhum et kéfir). J'ai ensuite été recrutée à l'IFREMER, où je suis en poste actuellement, pour développer des recherches appliquées sur la qualité et la sécurité microbiologique des produits de la mer.

I. SYNTHÈSE DES TRAVAUX RÉALISÉS PENDANT MES ÉTUDES UNIVERSITAIRES

I.1 Stage de fin d'étude d'ingénieur agronome de l'ENSAR option Biotechnologie et de DEA de "Génie enzymatique, Microbiologie et Bioconversion" de l'Université de Compiègne (6 mois).

"Métabolisme des acides organiques additionnés en faible quantité à un milieu de fermentation alcoolique". DEA effectué sous la direction de Mme Célestine-Myrtil à la Station de Technologie des Produits Végétaux, INRA, Guadeloupe.

Ces travaux avaient pour objet de déterminer le rôle de certains acides organiques (malique, citrique, cis et trans-aconitique) présents dans le jus de canne à sucre sur la fermentation et la production d'acides gras volatils au cours de la fermentation du rhum. Deux micro-organismes ont été étudiés : *Saccharomyces cerevisiae* et *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii*, en conditions d'anaérobiose stricte. Aucun des deux micro-organismes n'est capable d'utiliser ces acides organiques comme seule source de carbone. *Propionibacterium freudenreichii* excrète essentiellement des acides propionique et acétique. La production d'acide propionique est diminuée en présence des quatre acides cités. L'apport de 100 mg/l d'acides malique ou citrique entraîne une augmentation de 70% de la production d'éthanol par *S. cerevisiae*. Le rendement de conversion des sucres en éthanol est légèrement stimulé mais c'est surtout la consommation de sucre qui est augmentée. En revanche, les acides cis- et trans-aconitiques ont peu d'influence sur la fermentation alcoolique et la production d'acides gras volatils.

L'étude de l'utilisation de l'acide malique en conditions de fermentation rhumière a été poursuivie. Les cultures ont été effectuées en semi anaérobiose et les micro-organismes ont été utilisés séparément ou en co-culture. Une plus forte concentration d'acide malique (700 mg/l) a un effet inhibiteur de la fermentation alcoolique. La concentration optimale pour assurer un démarrage rapide des levures reste à déterminer.

I.2 Travail de thèse de doctorat, spécialité "Science des Aliments", de l'université de Nantes (3 ans).

"Interactions entre les bactéries lactiques et les levures isolées du grain de kéfir sucré". Thèse effectuée sous la direction du Pr Jean-Noël Hallet, Université de Nantes, dans le laboratoire de Génie Alimentaire de l'ENITIAA (suivi scientifique : Michel Pidoux).

Le kéfir sucré est une boisson rafraîchissante, légèrement pétillante, peu sucrée et peu alcoolisée, résultant de la fermentation lactique et (faiblement) alcoolique d'eau sucrée traditionnellement additionnée d'une rondelle de citron et d'une figue. Les

micro-organismes impliqués sont des bactéries lactiques et des levures, inclus dans une matrice polysaccharidique pour former ce qu'on appelle le "grain" de kéfir. La stabilité de ces grains est étonnante. Ils peuvent être utilisés pendant des années dans un milieu relativement pauvre en azote et en facteurs de croissance, sans perte d'activité ni grande modification de l'équilibre entre les différentes populations, bien que les bactéries lactiques soient exigeantes sur le plan nutritionnel. De nombreux auteurs pensent que les différents micro-organismes du grain vivent en symbiose et que les bactéries bénéficient de la libération, par les levures, de composés azotés et de vitamines nécessaires à leur développement, sans que cela n'ait jamais été montré. L'objet de ma thèse était de mieux comprendre les mécanismes d'interactions entre les levures et les bactéries lactiques isolées de grains de kéfir sucré. Différentes techniques ont été testées en vue de sélectionner des couples sur le critère de stimulation de la bactérie par la levure. Pour le couple *Lactobacillus hilgardii* * *Zygosaccharomyces florentinus*, la présence de la levure entraîne, à l'issue de 3 jours de culture mixte, un retard de la phase de dégénérescence du lactobacille et un accroissement de la production d'acide lactique de + 64%. Les stimulations augmentent avec l'âge de la culture levurienne. Sur milieu glucosé, elles s'expliquent en partie par l'excrétion par *Z. florentinus* de CO₂ et des acides pyruvique, acétique, succinique et propionique. Les substances azotées et les vitamines ne semblent pas être impliquées. Sur milieu saccharosé, elles sont dues à la libération de glucose et de fructose dans le milieu, lors de l'hydrolyse du saccharose par *Z. florentinus*. Parallèlement à ces phénomènes de stimulations, la croissance de la levure et la production d'éthanol sont inhibées par la présence de *L. hilgardii* ; cette inhibition, en partie expliquée par l'acide lactique excrété par le lactobacille, est levée lorsque la taille de l'inoculum levurien augmente. L'immobilisation des micro-organismes en gel d'alginate ne semble pas modifier les phénomènes d'interactions. L'effet stimulant de *Z. florentinus* sur la production d'acide lactique par *L. hilgardii* est confirmé lorsque les germes sont fixés dans des grains biosynthétisés par *L. hilgardii* producteur de polysaccharide. Enfin, l'utilisation des plans d'expériences a permis d'étudier l'influence sur les interactions de facteurs tels que la nature du sucre, le pH, la température, les concentrations en sucre et en extrait de levure, la taille de l'inoculum bactérien et le ratio initial levure/bactérie.

Leroi, F. and M. Pidoux (1993). Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 48-53.

Leroi, F. and M. Pidoux (1993). Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 54-60.

Leroi, F. and P. Courcoux (1996). Influence of pH, temperature and initial yeast : bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 138-146.

II. SYNTHÈSE DES TRAVAUX RÉALISÉS EN TANT QUE CADRE À L'IFREMER

II. 1 Description des fonctions occupées en qualité de cadre à l'IFREMER

J'ai été recrutée à l'IFREMER (centre de Nantes) en novembre 1993 au sein du **laboratoire de Génie Alimentaire**, sous la direction de **Jean-Luc Vallet**, avec pour mission de **structurer des actions de recherches en microbiologie alimentaire et d'encadrer un chercheur et un technicien**. En effet jusqu'en 1993, la microbiologie était uniquement considérée comme un outil analytique de soutien aux autres programmes et consistait essentiellement à vérifier la qualité bactériologique des produits développés au laboratoire. Depuis 2005, l'IFREMER s'est restructuré et le laboratoire de Génie Alimentaire a été regroupé avec deux autres laboratoires (Etudes Technico-Réglementaires et Biochimie et Qualité des Produits) pour former le département de **Sciences et Techniques Alimentaires Marines (25 permanents + thèses et post-doctorants)**.

En Juin 1994, le laboratoire a commencé à travailler par projets, jusqu'à la restructuration en 2005, et j'ai pris **la responsabilité** de celui qui traitait du "**fumage des produits marins**". Ce projet regroupait 9 cadres et 4 techniciens (cf page 2) et réunissait des compétences aussi variées que le **génie des procédés**, **l'analyse sensorielle**, la **biochimie** et la **microbiologie**. Ce projet comportait deux aspects spécifiques :

- **L'étude et le développement de nouveaux procédés de salage, séchage et fumage**. Ce premier volet était décomposé en quatre axes portant sur la connaissance, la formalisation, la simulation et l'expérimentation des procédés. Des outils de caractérisation de la matière première et du produit fini y étaient également développés.
- **La recherche dans le domaine de la microbiologie sur le poisson fumé**, domaine dans lequel je m'implique plus particulièrement. En effet, peu après mon arrivée, j'ai décidé d'orienter l'activité de recherche en microbiologie vers le développement de connaissances et la maîtrise des phénomènes d'**altération**, appliqués à un modèle : le saumon fumé. Le saumon fumé fait partie de la catégorie des produits transformés légèrement préservés, catégorie dans laquelle les problèmes d'altération sont les plus complexes et les moins étudiés. Ce choix correspondait également à une réalité économique, la France étant le premier producteur mondial de saumon fumé avec 20 000 tonnes/an. Depuis 2000, j'ai développé un nouvel axe de recherche sur les aspects **sanitaires**, entamant des travaux sur le germe **Listeria monocytogenes** qui représente le principal risque microbiologique lié à la consommation de produits fumés.

Depuis la restructuration en 2005, je suis **responsable d'une action impliquant une dizaine de personnes à l'IFREMER (plus partenaires externes)** : l'action **HURDLETECH**. Cette action porte sur le développement des **technologies barrières** pour assurer la **qualité** et la **sécurité** microbiologiques des **produits de la mer**. Elle correspond à un sous-projet que je coordonne (six partenaires européens) du projet intégré européen SEAFOODplus (80 partenaires). Dans cette action, je m'implique personnellement dans deux domaines :

- La quantification des effets des différentes barrières technologiques (sel, fumée, anaérobiose, température, congélation) sur *L. monocytogenes*, avec une étude plus spécifique sur l'effet des composés de la fumée.
- Le développement de la technologie de biopréservation : sélection de bactéries lactiques psychrotrophes à activité anti-bactérienne, identification, caractérisation des effets, application aux produits de la mer.

Au sein de ces différents projets et actions, j'anime donc l'activité des équipes concernées, je participe à la définition des axes de recherche et je discute les résultats et leur valorisation.

Enfin, pour ce qui est de mes actions au sein du département, je fais partie du jury permanent d'analyse sensorielle (solicitation environ 2 fois/semaine) et je participe à la rédaction de résumés ou d'analyses d'articles pour BIBLIOMER (journal destiné aux professionnels).

II. 2 Résumé des principaux résultats acquis à l'IFREMER

Les **produits de la mer semi-préservés** sont des produits qui ont subi un traitement de transformation très léger, comme le salage, le séchage, le marinage..., aboutissant à un pH final supérieur à 5 et un taux de sel inférieur à 6% en phase aqueuse. Les poissons fumés, les carpaccios de saumon ou de truite, le gravelax, les filets d'anchois marinés... sont quelques exemples de ces produits semi-préservés. Ces produits sont **très fragiles d'un point de vue microbiologique**. En effet, la matière première suit un procédé de transformation long avec une manipulation importante et donc un fort risque de contamination. De plus, aucune étape du procédé ne permet une élimination totale des micro-organismes ; enfin, le produit fini est souvent conservé pendant plusieurs semaines à basse température avant d'être consommé, permettant la multiplication de certains germes psychrotrophes qui peuvent **altérer les qualités organoleptiques** ou présenter un **risque pour la santé humaine**. De surcroît, ces produits sont souvent consommés sans aucune cuisson assainissante.

J'ai décidé de travailler sur le **saumon fumé**, en tant que **modèle** d'étude de cette catégorie de produits. En effet, le fumage des produits marins, qui comporte une étape de salage, puis de séchage et enfin de fumage à froid (25°C), regroupe les principales étapes des procédés mis en œuvre pour l'élaboration des produits semi-préservés. De plus, le saumon fumé est, en France, un exemple phare de ces produits semi-préservés, notre pays étant **leader mondial** dans ce domaine, tant pour la production que pour la consommation.

Lorsque j'ai pris mes fonctions à l'IFREMER, peu de travaux portaient sur la microbiologie du saumon fumé. Pourtant, de nombreux problèmes avaient été identifiés, notamment la dégradation relativement rapide des qualités organoleptiques, sans que pour autant aucune corrélation ait pu être faite avec les flores classiquement dénombrées ou les indices de qualité souvent proposés pour les poissons marins. Par ailleurs, il y avait peu de données concernant les risques microbiologiques associés à ce produit : pathogènes rencontrés, fréquence de contamination, possibilité de croissance, incidence des traitements technologiques... Autant de questions auxquelles j'essaie d'apporter des réponses.

II.2.1 Altération du saumon fumé

La durée de conservation du saumon fumé tranché emballé sous vide est de l'ordre de 3 à 6 semaines en France. Souvent, on observe bien avant cette date une perte des qualités gustatives du produit, et dans certains cas l'apparition de mauvaises odeurs et saveurs et d'une texture pâteuse. Une enquête d'analyse sensorielle que j'ai réalisée avec mes collègues sur 120 produits européens (projet européen « Eurosalmon ») a montré que 30% des produits étaient fortement altérés avant la DLC. S'il a été clairement montré que l'altération était d'origine bactérienne, les germes responsables ne sont pas identifiés et aucun indice de qualité n'est disponible.

Le but de mes recherches est donc de mieux connaître la microflore des produits fumés à froid (modèle saumon), d'identifier les germes responsables de l'altération et les composés volatils associés et de proposer des indices de qualité pour ce produit. Dans cette optique, j'ai développé des collaborations au niveau national et européen et je suis à l'origine de la mise en place d'un programme de recherche européen FAIR CT95-1202 « spoilage and safety of cold-smoked salmon » (1996-1999) dont j'ai coordonné les actions pour la partie IFREMER. Le travail sur l'altération se poursuit également dans le cadre de nos actions IFREMER.

II.2.1.1 Biodiversité de la flore du saumon fumé

J'ai tout d'abord travaillé sur l'**adaptation** au saumon fumé des méthodes **d'analyses microbiologiques** alimentaires traditionnelles, leur **optimisation** et leur **standardisation** au niveau européen. L'optimisation de ces méthodes a notamment permis de mettre en évidence des genres bactériens jouant un rôle important dans l'altération, genres non détectés par les techniques classiquement utilisées jusque là. Une **collection de plus de 2000 germes** isolés de saumon fumé a été créée. J'ai mis en place des **clés d'identification** spécifiques, basées sur des tests morphologiques et biochimiques, permettant de classer cette collection en une dizaine de grands groupes bactériens. Le développement de la technique **d'identification par PCR-RFLP** (polymorphisme des fragments de restriction) m'a permis de mettre en évidence la fragilité de certains tests biochimiques. Cette technique nous permettra une identification plus fiable et plus rapide des germes lors de nos prochaines analyses. Outre son utilité pour l'étude des mécanismes d'altération du saumon fumé, cette collection fait l'objet d'une **valorisation industrielle** via la société PROTEUS.

Afin de s'affranchir de l'étape de culture, qui peut, malgré les précautions, introduire un biais dans l'analyse microbiologique d'un produit, j'ai initié le développement **d'outils moléculaires pour l'étude de l'écologie microbienne** d'écosystèmes complexes. Cet outil consiste à extraire l'ADN total d'échantillons de saumon, amplifier l'ADNr 16S des bactéries par des amorces spécifiques des procaryotes, séparer les fragments par clonage, et les identifier par PCR-RFLP couplée au séquençage de l'ARN 16S. Un travail post-doctoral (Murielle Bourrain, 1999-2000), dont j'ai pris la co-direction avec Georges Barbier, a été mené conjointement avec le laboratoire CMM d'IFREMER Brest. Les résultats diffèrent de ceux obtenus par approche culturale, mettant en évidence **l'émergence de certains groupes bactériens**, notamment *Photobacterium phosphoreum*, **non déterminés par les méthodes classiques**. En revanche, certains groupes de gram + comme les bactéries lactiques et les *Brochothrix* ne sont pas toujours bien mis en évidence par

les techniques moléculaires. Ces travaux ont été poursuivis par Sophie Giacomazzi (post-doctorante en 2003, sous la responsabilité de mon collègue Jean-Jacques Joffraud et de moi-même). **Trois méthodes d'extraction de l'ADN** ont été comparées ; le kit commercial Qiagen donne les meilleurs résultats. Il est à noter que la congélation ou l'irradiation du saumon fumé a un impact négatif sur l'extraction de l'ADN. L'utilisation du gène *rpoB* comme marqueur de la biodiversité microbienne associée au saumon fumé a été envisagée. Une bonne amplification a été obtenue pour toutes les espèces bactériennes étudiées. Les amplicons (418-pb) ont été séparés avec succès par TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et une seule bande par souche a été obtenue, alors qu'avec des marqueurs classiques comme l'ADNr 16S, plusieurs bandes sont parfois observées, rendant l'identification difficile.

Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 111-121.

Leroi, F. (2002). La microbiologie de saumon fumé à froid : aspects hygiéniques et qualité. *Revue générale du froid*, 1028, 35-40.

Cardinal, M., H. Gunnlaugsdottir, M. Bjoernevik, A. Ouisse, J.L. Vallet and F. Leroi (2004). Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International*, 37, 181-193.

Giacomazzi, S., F. Leroi, C. L'Henaff and J.J. Joffraud (2004). *rpoB*-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis : a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 2, 130-134.

Giacomazzi, S., F. Leroi and J.J. Joffraud (2005). Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied microbiology*, 98, 5, 1230-1238.

Bourrain, M., H. Agogué, F. Leroi, J.J. Joffraud, F. Chevalier and G. Barbier (finalisation de la rédaction). Bacterial population changes during vacuum storage of cold-smoked salmon: The molecular approach offers new advances to identify spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*.

II.2.1.2 Potentiel d'altération des bactéries du saumon fumé

Dans le cadre du projet Européen « spoilage and safety of cold-smoked salmon », le **potentiel d'altération** des groupes bactériens précédemment isolés de saumon fumé a été testé. Pour cela, des cocktails de plusieurs souches par groupe bactérien testé ont été inoculés sur des dés de saumon fumé stériles (modèle développé au laboratoire), et les caractéristiques sensorielles et physico-chimiques du produit ont été suivies au cours de la conservation. L'analyse en composantes principales des données sensorielles a permis d'associer des odeurs caractéristiques aux différents groupes bactériens. Des analyses statistiques plus poussées ont permis d'établir le lien entre ces odeurs et l'altération du produit. Par ailleurs, de nombreux composés volatils ont été identifiés, mais les cinétiques montrent des évolutions souvent erratiques. Cependant **certains composés caractérisent l'une ou l'autre souche bactérienne** et la **corrélation avec les descripteurs sensoriels** est significative.

Bactéries	Niveau d'altération	Descripteur sensoriel	Composés volatils
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	faible	Neutre (herbe, vert, charcuterie)	Non détecté
<i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lb. farciminis</i>	fort	souffré, acide, aminé, chou	Acide acétique
<i>Carnobacterium piscicola</i>	faible	neutre/ beurre/plastic/caoutchouc	2-3 butanedione, 2-3 pentanedione
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	fort	beurre/plastic/rance/ fromage bleu	2-heptanone, 2-hexanone
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Faible à moyen	Fromage/aigre/neutre	TMA, diméthyl-disulphure, 2-3 butanol, 2-pentanol
<i>Serratia liquefaciens</i>	Moyen à fort	Fromage/aigre/neutre	TMA, diméthyl-disulphure, 2-3 butanol, 2-pentanol
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Faible à moyen	acide/neutre	Non déterminé

Les interactions entre germes peuvent modifier le métabolisme global. Il est donc apparu nécessaire de travailler sur le métabolisme des germes en co-culture. Les travaux sur **les interactions binaires** ont permis de relativiser les résultats obtenus en monocultures. Par exemple, l'altération observée avec *Lactobacillus sakei*, qui est de loin la plus forte et la plus précoce, est en fait atténuée en présence d'autres germes même, si certains ont eux aussi un pouvoir altérant en mono-culture (par exemple *Serratia liquefaciens*). Par contre, certaines associations se sont révélées comme étant fortement altérantes (exemple de *Carnobacterium* avec *Vibrio* ou *Brochothrix*) alors qu'aucun de ces deux genres ne l'était en culture pure.

En conclusion, **l'altération du saumon fumé** est un **phénomène très complexe**, résultant de l'interaction d'au moins 10 grands groupes bactériens évoluant différemment selon les caractéristiques physico-chimiques des produits.

Joffraud, J.J., F. Leroi and F. Chevalier (1998). Development of a sterile cold-smoked fish model. *Journal of Applied Bacteriology*, 85, 991-998.

Joffraud, J.J., F. Leroi, C. Roy and J.L. Berdagué (2001). Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the cold-smoked salmon flora. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 175-184.

Stohr, V., J.J. Joffraud., M. Cardinal and F. Leroi (2001). Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International*, 34, 797-806.

Joffraud, J.J., M. Cardinal, J. Cornet, J.S. Chasles, S. Léon and F. Leroi (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*.

II.2.1.3 Indices de qualité du saumon fumé

Contrairement au poisson frais où l'altération est liée au développement d'une seule espèce bactérienne déterminée, et où des modèles prédictifs de l'altération ont pu être proposés, l'altération du saumon fumé met en jeu de nombreux germes variant énormément selon l'usine et l'échantillon considéré. Pour pouvoir proposer des **indices de qualité faciles à mettre en oeuvre**, j'ai donc décidé d'aborder le problème par une **approche statistique** réalisée directement sur **des produits du commerce**, englobant toute l'hétérogénéité liée au produit et aux flores complexes. Un premier travail sur des produits représentatifs de la production française a été entrepris. Les corrélations entre la durée de vie restante (DRV), estimée par analyse sensorielle, et une quinzaine de mesures microbiologiques et biochimiques simples (utilisables par les industriels ou pour les contrôles réglementaires) ont été recherchées par régressions multiples pas à pas ascendantes. Un **modèle polynomial ($R^2=0.80$) reliant la DVR à deux facteurs** (nombre de lactobacilles énumérés sur milieu de Rogosa et concentration en Azote Basique Volatil Total) a été proposé.

J'ai alors élargi cette approche par une étude au niveau européen. La démarche était similaire mais d'autres mesures ont également été effectuées par nous même ou nos partenaires européens (amines biogènes, empreintes au nez électronique, composés volatils). De ce travail, il ressort que le **saumon fumé est un produit très hétérogène**, tant dans sa composition physico-chimique que microbiologique. Il n'y a pas de corrélation entre la durée de conservation et la composition physico-chimique du produit. La qualité est essentiellement liée à **l'hygiène en entreprise** et le nombre d'entérobactéries initial est un bon indicateur de cette qualité, même s'il ne permet pas de prévoir avec précision la durée de conservation. Le modèle prédictif de l'altération que j'ai développé sur des produits français peut s'appliquer aux produits européens mais sa fiabilité est moins nette ($R^2 = 0.60$). L'ajout d'autres mesures n'améliore pas la qualité de ce modèle. En ce qui concerne les composés volatils, cinq molécules semblent prometteuses pour discriminer les échantillons non altérés des échantillons altérés.

Leroi, F., J.J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 578-587.

II.2.1.4 Maîtrise de la qualité du saumon fumé

En 1994, j'ai contribué à la mise en place d'un programme régional VANAM (1994-98) portant sur l'"étude de stress physico-chimiques, liés au procédé de fabrication du saumon fumé, sur des bactéries d'altération". J'ai notamment **modélisé l'effet des paramètres technologiques (salage et fumage) sur la qualité du saumon fumé**, au travers d'un **plan d'expériences** réalisé directement dans la matrice poisson. Dans le domaine d'étude considéré (sel : 0 – 5% ; phénols totaux : 0 – 1 mg/100g), le sel a un fort effet inhibiteur sur toutes les flores étudiées (effet linéaire). L'effet de la fumée est également linéaire mais moins important que celui de sel et il n'y a pas d'interaction entre ces deux facteurs. En revanche, en ce qui concerne l'altération (déterminée par analyses sensorielles), une forte synergie entre le sel et la fumée a été identifiée. Un taux de fumée de 0.5 mg/100g ou de 3% de sel permet au produit de se conserver 1 à 2 semaines respectivement, alors qu'en association, le produit garde ses qualités pendant 4 semaines.

Au cours des années 1997-2000, **une étude plus fondamentale sur le stress bactérien** (modèle *Shewanella putrefaciens*) a été menée à l'occasion d'une **thèse (Laurence Leblanc) que j'ai co-dirigée** avec Axel Hartke de l'Université de Caen. *S. putrefaciens* apparaît naturellement résistant à la plupart des stress considérés (froid, fumée, anaérobiose), à l'exception du stress salin. La réponse de la bactérie aux différentes épreuves dépend des conditions antérieures d'incubation. Ainsi, un prétraitement par refroidissement à basses températures conduit à une adaptation au stress salin, et un prétraitement salin induit une sensibilisation au stress phénolique. L'étude des protéines de stress réalisée par électrophorèse bidimensionnelle révèle une inhibition de la synthèse d'un grand nombre de protéines pour les bactéries cultivées en présence de NaCl ainsi qu'une néosynthèse ou une surexpression d'une douzaine de polypeptides. Ces protéines ont fait l'objet d'**électrophorèses bidimensionnelles** préparatives pour être microséquencées. De plus, une approche génétique nous a permis d'identifier deux **gènes appartenant à la famille des cspA**, codant des protéines ayant plus de 70% d'homologies avec des CSPs d'*Escherichia coli* et de *Listeria monocytogenes*. L'étude des ARN messagers a montré que ces gènes étaient régulés au niveau de la transcription en réponse à des variations de la température de culture ; les protéines correspondantes ne semblent pas être directement impliquées dans la tolérance croisée à l'épreuve saline. Enfin, les composés présents dans la chair de saumon, comme la choline, augmentent le degré de tolérance au sel de la bactérie.

Parallèlement à ces travaux, **j'ai confirmé les réponses physiologiques** de *S. putrefaciens* au stress salin, directement **dans de la chair de saumon fumé** et non plus seulement en milieu semi-synthétique modèle.

Leblanc, L. F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (2000). Do stresses encountered during the smoked salmon process influence the survival of the spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens*? *Letters in Applied Microbiology*, 30, 437-442.

Leroi, F., J.J. Joffraud and F. Chevalier (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5°C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*, 63, 4, 502-508.

Leroi, F. and J.J. Joffraud (2000). Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. *Journal of Food Protection*, 63, 9, 1222-1227.

Leblanc, L., K. Gouffi, F. Leroi, A. Hartke, C. Blanco, Y. Auffray and V. Pichereau (2001). Uptake of choline from salmon flesh and its conversion to glycine betaine in response to salt stress in *Shewanella putrefaciens*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 93-103.

Leblanc, L., C. Leboeuf, F. Leroi, A. Hartke and Y. Auffray (2003). Comparison between NaCl tolerance response and acclimation to cold temperature in *Shewanella putrefaciens*. *Current Microbiology*, 46, 3, 157-162.

II.2.2 Sécurité sanitaire du saumon fumé

Les dangers (micro-organismes, parasites et molécules allergènes) liés à la consommation de saumon fumé ont longuement été débattus ces dernières années et les conclusions montrent que *Listeria monocytogenes* constitue le danger principal. *L. monocytogenes* est une bactérie pathogène responsable de la listériose humaine, maladie rare mais à létalité élevée (30 %). Cette bactérie ubiquitaire peut contaminer la matière première ou bien être apportée dans le produit au cours du procédé de transformation. Selon les études, 10 à 80 % des lots de saumon fumé seraient contaminés par *L. monocytogenes*. Si le niveau de contamination est en général très faible et ne représente pas un risque majeur en soi, toutes les études montrent que *L. monocytogenes* peut se multiplier dans le saumon fumé au cours de sa conservation, même à températures réfrigérées, et dépasser le seuil réglementaire toléré de 100 *L. monocytogenes* par gramme de chair.

Lors du programme européen "spoilage and safety of cold-smoked salmon", j'ai suivi des travaux sur les voies de contaminations du saumon fumé par *L. monocytogenes* et participé à l'encadrement avec l'ENITIAA et l'INRA de Rennes d'une thèse sur la biopréservation (Frédérique Duffes).

C'est à partir de l'année 2000 que j'ai développé au laboratoire une activité consacrée à la maîtrise de la croissance de *L. monocytogenes* dans les poissons fumés à froid. Dans ce cadre, j'ai négocié et réalisé de nombreux contrats avec des partenaires industriels. J'ai également développé un partenariat avec l'Ecole Nationale Vétérinaire (ENV) de Nantes sur le stress de *L. monocytogenes* engendré par le procédé de salage-fumage et coordonné un programme national AQS sur la biopréservation. Au niveau européen, j'ai bâti un programme, en tant que coordinateur (15 partenaires -organismes de recherche et PME-), sur l'utilisation de bactéries lactiques en vue de garantir la sécurité sanitaire du saumon fumé. Le programme a obtenu une très bonne note pour la partie scientifique mais a été refusé par la faiblesse d'un partenaire sur les emballages bio-actifs. Ce thème est actuellement repris dans le projet HURDLETECH que je coordonne et qui fait partie du projet intégré SEAFOODplus financé par l'Europe dans le cadre du 6^{ème} PCRD.

Duffes, F., C. Corre, F. Leroi, X. Dousset and P. Boyaval (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced and semi-purified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4°C and 8°C. *Journal of Food Protection*, 62, 12, 1394-1403.

Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval and X. Dousset (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold-smoked fish system stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 33-42.

Duffes, F., F. Leroi, X. Dousset and P. Boyaval (2000). Use of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* strain, isolated from fish, to control *Listeria monocytogenes* development in vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4°C. *Science des Aliments*, 20, 153-158.

II.2.2.1 Cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* dans les produits fumés

Lors de différents contrats avec des partenaires industriels, j'ai établi de nombreuses **cinétiques de croissance** de plusieurs souches de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé, selon différents modes de conservation (température, anaérobiose...). J'ai également dirigé un stagiaire de DESS financé par la société Aqualande pour un travail similaire dans la truite fumé. Toutes les études montrent une croissance de *L. monocytogenes* dans les poissons fumés, **faible mais possible à 1°C**, une croissance relativement **importante à 4°C** avec une **très forte** accentuation à **8°C**.

II.2.2.2 Effet des paramètres technologiques sur *L. monocytogenes*

J'ai initié des travaux sur **l'effet du procédé de salage-fumage** à froid sur **l'état physiologique de *L. monocytogenes***, en partenariat avec l'ENV de Nantes. En 2002, j'ai encadré un stage ingénieur sur le sujet. Pour des raisons de sécurité évidentes, il est impossible de travailler avec le germe *L. monocytogenes* dans le hall technologique de l'IFREMER. J'ai donc mis en place un protocole expérimental permettant de simuler au laboratoire le procédé industriel de salage-fumage. Des cellules cultivables de *L. monocytogenes* (souches épidémiques) ont été inoculées dans des steaks de saumon frais stérilisés par ionisation. Les produits ont ensuite subi les différentes étapes du procédé de salage-fumage. Les cellules de *Listeria* ont été extraites à différentes étapes du procédé **par Immuno Séparation Magnétique**. Elles ont fait l'objet de colorations de viabilité, de tests de cultivabilité et leur virulence a été testée sur modèle souris. Aucune bactérie sous **forme viable non cultivable** n'a été mise en évidence. Le salage est le facteur qui a le plus fort effet bactéricide mais globalement l'effet des différentes étapes du procédé reste assez faible. Par ailleurs, la **virulence** des souches n'est pas modifiée par le procédé.

Ribeiro Neunlist, M., M. Ralazamahaleo, J. M. Cappelier, V. Besnard, M. Federighi and F. Leroi (2005). Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection*, 68, 1, 85-91.

II.2.2.3 Biopréservation du saumon fumé

J'ai testé l'efficacité de **différentes molécules chimiques** (contrat avec Aqualande) ainsi que du système **enzymatique lactoperoxydase** (contrat avec la société Bioserae productrice de cette enzyme) pour inhiber le développement de *L. monocytogenes* dans la chair de poisson fumé. Dans l'ensemble, **l'effet inhibiteur reste très faible, voire nul**.

J'ai alors entrepris de travailler sur un procédé original de contrôle du développement de *L. monocytogenes*. Ce procédé, la **biopréservation**, consiste à limiter la croissance de *L. monocytogenes* par l'utilisation de bactéries lactiques sélectionnées.

Plus de 2000 souches de bactéries lactiques, isolées de 120 lots de saumon fumé provenant de toute l'Europe ont été testées pour leur pouvoir anti-listeria. **161 (7.6%) souches ont révélé un fort effet inhibiteur** et ont fait l'objet d'une caractérisation plus poussée. La plupart de ces germes sont des *Carnobacterium piscicola* et l'effet inhibiteur est lié à la production de **bactériocine**. Certaines de ces souches ont également montré un effet sur des germes responsables de l'altération. En 2002, j'ai poursuivi les travaux d'application de ces germes au stade pilote avec un partenaire industriel (contrat 02/5210817/YF, « Prévention de *Listeria* et de flores altérantes dans le saumon fumé », résultats confidentiels).

Par ailleurs, j'ai **coordonné un programme de recherche AQS (2001-2003)** sur la « Maîtrise du risque *L. monocytogenes* dans le saumon fumé par utilisation raisonnée de souches bio-protectrices de *Carnobacterium* spp. », impliquant l'IFREMER, l'ENITIAA, l'ASEPT (association pour l'ASEPTIE, Laval) et la CITPPM (Confédération des Industriels Transformateurs des Produits de La Pêche Maritime). Une partie du projet portait sur la recherche de caractères pouvant conférer un avantage écologique à certaines souches de *Listeria* (adhésion, production de monocine, résistances aux désinfectants ...) et sur l'amélioration des procédures d'hygiène en entreprise. L'autre partie, dans laquelle je suis plus particulièrement impliquée, portait sur l'utilisation de ces bactéries lactiques dans le produit fini. J'ai **co-dirigé** avec Marie France Pilet (ENITIAA) un travail de **thèse (Anne Brillet)** sur ce sujet. Le potentiel d'inhibition de 3 souches de bactéries lactiques (collection IFREMER et ENITIAA) a été testé sur une vaste collection de souches de *L. monocytogenes* représentatives des souches rencontrées dans les saurisséries françaises. Les tests ont été effectués en milieu modèle puis sur saumon fumé. Une des souches, ***Carnobacterium divergens* V41**, a donné de très bons résultats, permettant de **maintenir le taux de *L. monocytogenes* inférieur à 50 ufc/g** tout au long de la conservation sous vide à 4 et 8°C, grâce à la production *in situ* de la divercine V41. La production de la souche bioprotectrice a été **optimisée en fermenteur** et une application sur différents produits du commerce a ensuite été réalisée. Outre les effets sur *L. monocytogenes*, la bactérie lactique sélectionnée modifie peu l'écologie microbienne du produit ni ses caractéristiques physico-chimiques ou sensorielles, **confirmant les possibilités d'application de cette technologie**. L'application à d'autres produits (**saumon mariné**) a été développée avec succès en partenariat avec le CEVPM dans un contrat financé par la région Nord Pas de Calais. La souche a empêché le développement de *L. monocytogenes* et a également retardé l'altération du produit.

C. divergens V41 produit de la tyramine, amine biogène non réglementée mais peu désirable dans les aliments. Bien que les concentrations produites dans le saumon

inoculé par *C. divergens* V41 ne dépassent pas celles rencontrées dans des produits du commerce, nous avons recherché à pallier à ce problème. Aucun mutant non producteur de tyramine n'est apparu spontanément chez *C. divergens* V41. Par ailleurs, 48 souches de *Carnobacterium* représentatives de la collection de 167 souches inhibitrices de *L. monocytogenes* ont été testées, dans le cadre d'un DEA (Sébastien Matamoros), mais toutes présentaient le gène de la tyramine décarboxylase (TDC) et produisaient de la tyramine (dosage HPLC). L'utilisation de technique de biologie moléculaire telle que la mutagenèse insertionnelle a été envisagée sur *C. divergens* V41 mais n'a donné aucun résultat, la souche sauvage étant difficile à transformer. Afin de favoriser l'apparition de mutant tyramine négatif l'utilisation d'un agent mutagène, l'éthylméthanesulfonate, a été choisie. De plus, les mutants résultants de la mutagenèse chimique ne sont pas considérés comme des OGM puisqu'ils sont mutés aléatoirement, sans ajout d'ADN exogène. Cette caractéristique est essentielle pour que les souches mutées puissent être utilisées dans les aliments dans le respect de la réglementation actuelle. **Un des mutants aléatoires de *C. divergens* V4 s'est révélé non producteur de tyramine**, tout en conservant sa production de divercine et son effet inhibiteur de *L. monocytogenes*. Le séquençage du gène de structure de la TDC chez le mutant a révélé la présence d'une **mutation simple** qui entraîne un codon STOP dans la séquence protéique de la TDC, confirmant la **stabilité de la mutation**.

- Leroi, F., N. Arbey, J.J. Joffraud and F. Chevalier (1996).** Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf life of vacuum-packed cold smoked salmon. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 497-504
- Brillet, A., M.F. Pilet, P. Prévost, A. Bouttefroy and F. Leroi (2004).** Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1029-1037.
- Richard, C., F. Leroi, A. Brillet, C. Rachman, N. Connil., D. Drider, M.F. Pilet, B. Onno, X. Dousset and H. Prévost (2004).** Control development of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon: interest of the biopreservation by lactic bacteria. *Lait*, 84, 1-2, 135-144.
- Brillet, A., M.F. Pilet, H. Prévost, and F. Leroi (2005).** Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. 104, 3, 309-324.
- Brillet, A., M.F. Pilet, S. Horakova, P. Courcoux, H. Prévost and F. Leroi (submitted).** Optimization of growth and bacteriocin production of *Carnobacterium divergens* V41, an interesting bacteriocin-producing strain for the biopreservation of cold-smoked fish, by batch fermentation in a culture medium deprived of protein of animal origin. *Journal of Food Protection*.
- Brillet, A., C. Blanchet-Chevrollier, H. Prévost, F. Leroi and M.F. Pilet (soumis).** Isolation and characterization of a stable tyrosine decarboxylaseless mutant of a bacteriocin-producing *Carnobacterium divergens* strain and its application in cold-smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost H. and F. Leroi (submitted)** Selection and evaluation of seafood-born acid lactic bacteria as protective cultures for the biopreservation of seafood products. *International Journal of Food Microbiology*.

PROJET DE RECHERCHE ET PERSPECTIVES

Conscients des enjeux scientifiques et socio-économiques que représente la recherche, nous sommes entrés dans une période de profonde mutation. L'Union européenne, l'état et les régions déploient de nouveaux moyens pour structurer la recherche, avec la volonté de mailler les compétences pour une meilleure efficacité et lisibilité au niveau mondial. Mon projet de recherche s'inscrit dans cette évolution en réseau. Ma demande d'Habilitation à Diriger des Recherches, au-delà d'une démarche personnelle, est également incitée par l'IFREMER afin que nous puissions accueillir des doctorants et développer nos forces de recherche.

Les progrès de la recherche en santé publique, l'amélioration des plans de surveillance épidémiologique, la surveillance de pathogènes émergents, la meilleure connaissance des maladies à long terme liées à l'alimentation ont indéniablement entraîné une prise de conscience du consommateur de l'impact de l'aliment sur sa santé. Il souhaite avoir à sa disposition à la fois des aliments pratiques à consommer, sûr d'un point de vue sanitaire, et avec des qualités nutritionnelles et gustatives reconnues. En tant qu'établissement public de recherche, l'IFREMER, en collaboration avec d'autres partenaires, se doit de contribuer à cette demande sociétale. Le thème de la qualité et de la sécurité des produits marins s'inscrit dans le plan quadriennal de l'IFREMER. Pour apporter des éléments de réponse à ces questions, tout en tenant compte du caractère pluridisciplinaire du département STAM, je souhaite développer dans les années à venir deux grandes actions.

- La première concerne le développement de recherches cognitives dans les domaines suivants :
 - acquisition et utilisation d'une méthodologie nouvelle pour le département : la **microbiologie prévisionnelle**, qui aidera à prévoir et gérer le développement bactérien dans les produits de la mer en fonction des paramètres environnementaux liés à la technologie de transformation et de conservation.
 - réduction du risque microbiologique par l'application de différents **procédés barrières** et par une meilleure compréhension des mécanismes de **stress bactérien**
- La deuxième est applicative et découlera en partie des résultats de la première action. Elle a pour but d'accompagner le développement d'une **filière en plein essor en France: la crevette tropicale**

I. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE

La microbiologie prévisionnelle rassemble les disciplines de microbiologie, d'ingénierie et de statistique pour fournir des prévisions utiles sur le comportement microbien (Schaffner et Labuza, 1997). La microbiologie prévisionnelle permet de proposer des modèles mathématiques qui décrivent quantitativement l'effet combiné des paramètres environnementaux et qui peuvent être employés pour prévoir la croissance, la survie ou l'inactivation d'un micro-organisme, apportant des informations importantes sur la sécurité du produit ou la durée de conservation. Cette science, née dans le début des années 20, a pris son essor dans les années 80 avec le développement du marché des produits alimentaires frais. Cette tendance s'est poursuivie dans les années 90 avec l'utilisation généralisée des ordinateurs (Mafart, 2005).

C'est une discipline que nous n'avons jusque là pas abordée dans notre département, et qui est peu développée pour les produits de la mer dans le pôle de recherche de la région Pays de Loire. Cette action permettrait un rapprochement avec des laboratoires français et européens compétents dans le domaine : ADRIA Quimper, AFSSA Maison Alfort, ENV Lyon, INRA Jouy-en-Josas, IFR (Angleterre), DIFRES (Danemark) etc... Brièvement, la méthodologie comprend cinq étapes :

<p><u>Génération de données</u></p> 	<p>De grandes quantités de données expérimentales sont nécessaires pour prévoir l'effet des facteurs de contrôle sur la croissance, la survie ou l'inactivation des micro-organismes. Ces données sont souvent générées en utilisant des milieux liquides de laboratoire, avec les niveaux des facteurs contrôlés (pH, NaCl, etc.) qui sont plus faciles à ajuster que dans le produit alimentaire. En outre, des méthodes automatisées pour mesurer la croissance microbienne telle que l'absorbance ou les mesures de conductibilité peuvent être employées pour faciliter la génération des données dans des milieux liquides.</p>
<p><u>Modèles primaires</u></p> 	<p>Les courbes de croissance sont ajustées par des modèles de croissance pour extraire les paramètres cinétiques (par exemple temps de latence, taux de croissance, etc.). Des modèles primaires simples sont disponibles comme le modèle exponentiel à deux paramètres (Lodge et Hinshelwood, 1943), le modèle logistique à trois ou quatre paramètres cité par Dalgaard <i>et al.</i> (1994), le modèle de Baranyi (Baranyi et Roberts, 1995) le modèle logistique avec délai et rupture (Ross, 1996), le modèle de Gompertz à quatre paramètres (Gompertz, 1825), réécrit par Zwietering <i>et al.</i> (1990), le modèle de Richards (Richards, 1959), modifié par Dalgaard et Koutsoumanis (2001)... La méthode des temps de détection est également utilisée notamment si l'on travaille avec un lecteur automatisé de densité optique.</p>
<p><u>Modèles secondaires</u></p> 	<p>Les modèles secondaires décrivent l'évolution des paramètres cinétiques des modèles primaires (latence, N_{max}, μ_{max}), par rapport aux conditions de l'environnement, représentées par des variables telles que pH, T°C, a_w...</p> <p>Les modèles polynomiaux Ils consistent à décrire simultanément l'effet de tous les facteurs environnementaux à l'aide de fonctions polynomiales. Le développement de ces modèles se fait selon un plan d'expériences défini et dans une gamme de variation donnée. Ces modèles donnent de bonnes prévisions dans le domaine où ils ont été établis. De plus ils peuvent facilement prendre en compte les interactions entre les facteurs. Leur principal défaut réside dans le fait que les paramètres sont sans signification biologique, et que ces modèles ne sont pas extrapolables à l'extérieur du domaine d'étude ni à d'autres matrices. Il devient donc impératif de réaliser les expériences directement dans la matrice choisie (à l'IFREMER, matrice hétérogène type poisson), ce qui est souvent très laborieux.</p> <p>Les modèles modulaires Ils consistent à modéliser individuellement l'effet de chaque facteur. Pour la température, le modèle d'Arrhénius (1889) puis le modèle "racine carrée" (Ratkowsky <i>et al.</i>, 1982) ont été proposés. D'autres modèles garantissant une simplicité d'utilisation ont ensuite été développés. Il s'agit des modèles dits "cardinaux" basés sur des paramètres simples ayant une signification biologique comme les valeurs minimales, maximales et optimales de croissance. Plusieurs modèles ont été développés pour la température $\tau(T^\circ)$, le pH $\rho(pH)$, l'activité de l'eau $\alpha(a_w)$, les composés inhibiteurs $\gamma(c)$. A partir de ces modules simples, un modèle général prenant en compte l'effet combiné de l'ensemble des facteurs environnementaux est ensuite élaboré :</p> $\mu_{max} = \mu_{matrice} \times \tau(T^\circ) \times \rho(pH) \times \alpha(a_w) \times \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \text{ Augustin et Carlier (2000a)}$

	Les valeurs cardinales (T° , pH, a_w , ect.) sont déterminées en milieu liquide, souvent avec des outils automatisés de lecture de DO. Une seule expérience dans la matrice est nécessaire pour déterminer le $\mu_{matrice}$. C'est un des avantages de ces modèles, qui peuvent facilement être transférables à différentes matrices. Les interactions entre les facteurs étaient jusqu'à présent mal prises en compte par ces modèles, mais des modules d'interaction ont récemment été proposés pour certains facteurs.
<u>Validation en produit</u> 	Les valeurs des paramètres cinétiques prévues par le modèle sont comparées aux valeurs obtenues en produit naturellement contaminés ou artificiellement inoculés (challenge test). Différents tests sont disponibles pour évaluer la qualité d'un modèle, comme le facteur de biais ou d'exactitude.
<u>Modèle tertiaire</u>	Les modèles validés peuvent être inclus dans un logiciel d'application.

En 2006, j'ai complété mes connaissances bibliographiques au cours d'un stage de formation organisé par l'ADRIA de Quimper. Une formation sur les plans d'expériences est à envisager dans les années à venir.

La méthodologie de la microbiologie prévisionnelle sera utilisée pour **quantifier et prévoir l'effet des différentes barrières technologiques** mises en œuvre lors de la fabrication de produits légèrement préservés, sur la croissance de germes pathogènes et de germes d'altération. En ce qui concerne les pathogènes, de nombreux résultats sont disponibles dans différentes bases de données (ComBase Predictor, Food MicroModel, Pathogen Modelling Program...). Celles de Sym'previus (www.symprevius.org) sont à mon avis les plus pertinentes puisqu'elles pourront être réutilisées pour différentes matrices alimentaires. Malgré tout, beaucoup de travaux restent à faire, notamment sur :

- L'effet de facteurs peu connus comme celui de la fumée, primordial pour les produits de la mer (la France est le premier producteur mondial de saumon fumé)
- L'effets des barrières sel, température, pH... sur des pathogènes moins étudiés mais important en microbiologie marine (*Vibrio parahaemolyticus* par exemple)
- L'effets des barrières sur des germes responsables de l'altération des produits de la mer (*Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* *Lactobacillus sakei*, *Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens* etc...). Aucune donnée n'est actuellement disponible sur ces germes
- L'effets des barrières sur des germes producteurs de composés indésirables comme l'histamine (entérobactéries, *Photobacterium histaminum* ...)
- L'adaptation des modèles existants à la matrice poisson, très peu étudiée par rapport aux produits carnés et laitiers

Les paragraphes suivants décrivent les actions qui seront développées dans les années à venir.

I.1. Incidence de la fumée sur *Listeria monocytogenes*

Dans les produits de la mer fumés à froid, comme le saumon fumé par exemple, *L. monocytogenes* représente le pathogène majeur pouvant poser problème.

De nombreux travaux ont déjà été réalisés sur l'effet du sel, du pH, de la température et de certains inhibiteurs comme les acides organiques sur la croissance de ce pathogène, et des modèles secondaires ont été proposés (Augustin et Carlier, 2000 a et b). Ils sont intégrés à la base de données Sym'previus. En revanche, l'effet de la

fumée est très mal connu. Certains résultats issus de travaux réalisés *in situ*, indiquent que la fumée a un fort effet inhibiteur (Gimenez et Dalgaard, 2004) alors que d'autres données indiquent peu de corrélation entre ce facteur et le niveau de *L. monocytogenes* (données ASEPT non publiées ou AFSSA présentées le 29-11-06 lors de la journée d'information sur *L. monocytogenes*). Utilisant l'approche modulaire, certains auteurs ont proposé un modèle de type $\Psi([\text{phenol}]) = 1 - ([\text{phenol}]/\text{MIC})^p$ avec des valeurs de p et de MIC (concentration minimale inhibitrice) postulées mais non validées (basée sur une étude de Membré *et al.*, 1997). En 2006, Cornu *et al.* ont montré que ce modèle n'était pas adapté pour prévoir le développement de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la fraction phénolique de la fumée. Nous modéliserons le taux de croissance maximum (μ_{max}) de *L. monocytogenes* (plusieurs souches devront être testées) en fonction de la concentration en 10 composés phénoliques identifiés dans la fumée par Serot *et al.* (2004). Les expériences seront réalisées en microplaques avec un lecteur de DO automatisé, le BIOSCREEN, par la méthode des dilutions successives. Basé sur ces modules individuels, un modèle multiplicatif intégrant les 10 composés sera établi et validé, tout d'abord en milieu liquide, puis dans la matrice saumon fumé. Des modules d'interaction pourront être rajoutés si nécessaire. Ce travail permettra de mettre en évidence l'importance relative des différents composés phénoliques dans les phénomènes d'inhibition. Selon les résultats, il sera possible d'orienter la production préférentielle de tel ou tel composé lors de la génération de fumée, en jouant sur divers paramètres technologiques (température de combustion, taux d'aération, pyrolyse par plaques thermostatées, autocombustion ou friction, essence de bois...). Les producteurs de fumée liquide contactés sont également très intéressés par les résultats afin d'orienter la composition de leurs extraits.

Il est possible que la fraction phénolique ne suffise pas à expliquer à elle seule l'effet inhibiteur de la fumée. Cette hypothèse sera vérifiée par la validation -ou non- sur des produits fumés traditionnellement, du modèle créé à partir des seuls composés phénoliques pour représenter l'effet "fumée". Par ailleurs, nous modéliserons l'effet de différentes fumées liquides dont la composition biochimique sera déterminée. S'il s'avère que l'effet antimicrobien n'est pas bien corrélé aux différents composés phénoliques, d'autres composés majeurs de la fumée seront étudiés. En cas de difficultés (les composés sont *a priori* très nombreux), on pourra envisager l'étude de fractions collectées en sortie de chaîne chromatographique préparatrice puis en affinant l'étude des fractions les plus actives. Un rapprochement avec les producteurs de fumée liquide qui pourraient nous fournir différentes fractions lors de leur distillation sera également envisagé.

Dans une perspective plus lointaine, des travaux de cette nature pourront être étendus à d'autres germes (germes d'altération par exemple) et apporteront des connaissances génériques sur l'effet antimicrobien des composés de la fumée.

Une partie du programme **microbiologique** cité s'inscrit dans le projet **régional AISQAL (2007-2010)**, Action 1.4 : Caractérisation physiologique et moléculaire de la réponse aux stress de *L. monocytogenes* et *C. jejuni* et implique l'IFREMER et l'UMR-INRA 1014 ENVN/ENITIAA.

Ce projet AISQAL inclut également une action sur la composition biochimique de la fumée. Celle-ci doit être déterminée dans un **travail de thèse qui démarrera en Septembre 2007 (financement PONAN - Pôle Nantais d'Alimentation Nutrition)**.

Par ailleurs, une **thèse sur la relation entre la composition de la fumée et les paramètres de production** est demandée par l'UMR-GEPEA et le département STAM pour l'année 2007.

Enfin, afin de renforcer les compétences en biochimie du département STAM, le recrutement d'un cadre biochimiste a été demandé.

Parallèlement à cette approche, nous envisageons également d'étudier le facteur "fumée" en interaction avec d'autres facteurs environnementaux liés à la technologie du fumage des produits marins. Certains facteurs, comme la congélation partielle ou l'emballage sous vide peuvent difficilement être étudiés par l'approche modulaire. Par ailleurs, cette approche, très performante lorsqu'il s'agit d'étudier un germe précis (un pathogène par exemple), l'est beaucoup moins lorsqu'il s'agit d'étudier les mécanismes d'altération, qui sont, dans le cas du saumon fumé, le résultat d'interaction complexes entre plus d'une dizaine d'espèces microbiennes (Leroi *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001, Joffraud *et al.*, 2006). Ainsi, une approche polynomiale me semble plus adaptée pour apporter aux industriels des réponses rapides et claires quant à l'effet des différents facteurs technologiques sur la croissance des flores pathogènes ou altérantes dans leurs produits. Les facteurs envisagés sont le sel, la fumée, la congélation partielle utilisée pour faciliter le tranchage des produits et dont l'effet nous est souvent demandé par les industriels, l'emballage sous air, sous vide ou sous atmosphère modifiée et la température de conservation.

Les modèles polynomiaux n'étant pas transférables d'une matrice à une autre, les expériences seront réalisées directement sur du saumon, dans lequel il faudra maîtriser les différents facteurs cités (aspects technologiques importants). Un plan d'expériences factoriel fractionnaire avec répétitions sera élaboré pour déterminer les paramètres du modèle, dans un domaine compatible avec des productions industrielles. Pour l'incidence sur *L. monocytogenes*, les produits seront artificiellement inoculés par un cocktail de *L. monocytogenes* représentatif des souches rencontrées dans les saurissiereries (collection européenne mise en place dans le SEAFOODplus). Pour les flores d'altération, nous étudierons essentiellement le comportement des flores endogènes, ainsi que des réponses sensorielles et biochimiques pertinentes pour évaluer le niveau d'altération. Les analyses microbiologiques seront réalisées au cours du stockage et les paramètres des modèles primaires (temps de latence, μ_{\max} et taux maximum de germes) seront extraits des courbes. Ils seront ensuite modélisés en fonction des facteurs environnementaux à l'aide de polynômes (modèles secondaires). Des expériences supplémentaires seront réalisées pour valider le modèle. Les réponses permettront de hiérarchiser l'effet des différents facteurs étudiés et de mettre en évidence des éventuelles interactions.

Ces derniers travaux s'inscrivent dans la dernière phase du **projet européen HURDLETECH du SEAFOODplus (2007-2008)**.

Ce genre d'étude peut bien sûr être réalisé sur d'autres produits et avec d'autres facteurs. Il nécessite de bien connaître la méthodologie des plans d'expériences et le traitement statistique des données.

I.2 Adaptation des flores à la matrice

Dans les années à venir, nous envisageons également d'utiliser la méthodologie de la microbiologie prévisionnelle pour étudier les **interactions entre les flores et la matrice alimentaire**. L'influence des paramètres environnementaux (T° , pH, aw,

CO₂) sur la croissance de certains germes pathogènes ou altérants les produits de la mer (type crevette, saumon frais, saumon fumé ...) sera étudié avec l'approche modulaire décrite précédemment. Ces travaux permettront de prévoir si certains germes présentent un avantage écologique dans la matrice étudiée, et de mieux comprendre l'écologie microbienne des produits de la mer (par exemple pourquoi les bactéries lactiques, et plus particulièrement les carnobactéries, sont dominantes dans la flore du saumon fumé au détriment des bactéries Gram négatifs, pourtant typiques du poisson). De tels travaux seront également réalisés sur certaines bactéries lactiques bioprotectrices que nous avons déjà en collection, afin de choisir les souches les plus adaptées à chaque produit étudié.

Si les seuls facteurs environnementaux n'expliquent pas la prédominance de certains germes, alors les interactions entre les flores elles mêmes devront être quantifiées et expliquées (cf l'approche proposée au § III.1.3 pour le cas des souches bioprotectrices et de *L. monocytogenes*).

II. TECHNOLOGIES BARRIERES ET MECANISMES DE STRESS

La maîtrise de la qualité et de la sécurité des produits de la mer passe par le développement des procédés barrières et une meilleure connaissance des mécanismes de stress bactérien. Nous avons parlé des barrières "technologiques" (sel, fumée ...) dans le paragraphe I. Cependant, je souhaite développer aussi d'autres actions, notamment dans le domaine de la **biopréservation**, sur lequel nous travaillons déjà depuis quelques années, mais aussi sur des technologies alternatives de décontamination comme la **lumière pulsée**.

II.1 Biopréservation et mécanismes d'interactions bactériennes

Le travail entamé dans le projet HURDLETECH du SEAFOODplus, qui se terminera fin 2008, consiste à **sélectionner des bactéries lactiques psychrotrophes à activité anti-bactérienne originale**, les identifier, caractériser les effets inhibiteurs et tester les applications aux produits de la mer. Avec Marie-France Pilet de l'ENITIAA, je co-dirige une thèse (Sébastien Matamoros) qui a débuté fin 2004 et se poursuivra jusqu'à fin 2007 (directeur Hervé Prévost). Les résultats obtenus jusque là nous ont permis d'isoler sept bactéries lactiques dont l'activité antibactérienne ne se limite pas à *L. monocytogenes*, comme c'est le cas des carnobactéries que nous avons beaucoup étudiées dans les années passées. Parmi les sept germes protecteurs sélectionnés, des espèces tout à fait nouvelles pour une application dans la biopréservation des produits marins ont été trouvées : *Leuconostoc gelidum/inhae*, *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium alterfunditum* et *Lactobacillus fuchuensis*. En milieu liquide, ces bactéries inhibent des germes pathogènes et altérants, Gram + ou Gram -, et une action *in situ* sur l'augmentation de la durée de conservation de la crevette a été mise en évidence, basé sur des tests sensoriels. Pourtant, aucune corrélation avec les indices microbiologiques mesurés n'a pu être mise en évidence.

Le travail à venir consistera à étudier l'**adaptation au froid** de ces bactéries. Par ailleurs, en dehors du projet HURDLETECH, nous chercherons à **préciser les**

mécanismes d'inhibition, à prévoir l'effet inhibiteur et à appliquer cette technologie aux produits de la mer, seule ou en association avec d'autres barrières.

II.1.1 Adaptation au froid

Les travaux seront réalisés par Sébastien Matamoros. Ils porteront sur *Lactococcus piscium* et *Leuconostoc gelidum/inahe*. Le but est d'essayer de comprendre les mécanismes qui permettent à ces souches de pousser à basse température, alors que la plupart des bactéries lactiques sont mésophiles. Tout d'abord, le taux maximum de croissance des sept bactéries sera étudié en fonction de la température, et comparé à celui de germes de référence. Les expériences seront réalisées à l'aide du lecteur automatisé de densité optique (BIOSCREEN) disponible au laboratoire, avec la technique des dilutions successives (cf § I.) ou par dénombrement classique en boîte de Petri pour les conditions de croissance très lente.

Quand une bactérie est transférée de sa température optimale de croissance à des températures plus basses (autorisant toutefois la croissance), la réponse au choc est immédiate et se traduit par la synthèse transitoire de protéines de choc froid appelées CSPs (cold shock proteins). Ce phénomène est suivi par la synthèse continue de protéines d'acclimatation au froid (CAPs - cold adaptation proteins), beaucoup moins étudiées. Les protéines synthétisées par nos souches à des températures optimales de croissance (environ 25°C, à préciser), après un choc froid (par exemple 5°C) ou lors de la croissance après plusieurs repiquages à 5°C seront détectées par électrophorèse bidimensionnelle. Cette technique n'existe pas à l'heure actuelle au département. Elle devra être mise en place par Sébastien Matamoros qui ira se former à l'ENV de Nantes, et être pérennisée par Frédérique Gigout (technicienne au département STAM). Une partie du matériel est déjà disponible à l'IFREMER car cette technique a été utilisée pour l'étude de protéines marqueurs de la fraîcheur du poisson. Les résultats seront comparés aux profils obtenus pour les souches de référence. La partie N-terminale des protéines néosynthétisées ou de celles sur ou sous exprimées, pourra être séquencée et comparée avec les séquences d'acides aminés et les protéines de différentes banques de données. Une autre approche pourra consister à fabriquer des anticorps anti-CAPs fabriqués à partir de CAPs déjà mis en évidence chez d'autres germes (par exemple *Arthrobacter* ou *Pseudomonas*) pour aller rechercher ces éventuelles CAPs synthétisés par nos germes.

II.1.2 Mécanismes d'inhibition

Les mécanismes d'inhibition de ces germes bioprotecteurs doivent être élucidés pour mieux les maîtriser.

Après une sélection des couples "germe bioprotecteur/germe pathogène ou altérant" pour lesquels une inhibition est observée, la production de composés inhibiteurs (acides organiques, bactériocines, peroxyde d'hydrogène...) sera recherchée par des techniques classiques (dépôt de surnageant de culture ayant subi différents traitements). Dans le cas où une activité de type peptidique serait mise en évidence, la molécule active pourra être purifiée. Les outils de chromatographie échangeuse de cations, chromatographie en phase inverse C18, électrophorèse verticale et électrophorèse automatisée utilisée pour des molécules de faible poids moléculaire sont disponibles au département STAM ; ce

sujet permettra un rapprochement avec le personnel du département spécialisé dans l'étude des protéines et des peptides.

La compétition nutritionnelle pourra être mise en évidence par la recherche de l'utilisation préférentielle de certains nutriments (détermination de l'activité protéolytique, utilisation de nutriments sur milieux minimum...).

La capacité par les bactéries bioprotectrices à produire des composés impliqués dans les phénomènes de communication cellulaire (quorum sensing) pourra être recherchée. Ces molécules sont connues pour intervenir dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la synthèse de facteurs de virulence chez les bactéries pathogènes (Camilli et Bassler, 2006). Certaines ont été mises en évidence chez les bactéries lactiques (DeKeersmaecker et Vanderleyden, 2003) et peuvent jouer un rôle dans les interactions microbiennes au sein d'une matrice alimentaire.

Une dernière approche pourrait être de considérer la présence de bactéries protectrices comme un stress pour la bactérie cible dont on peut étudier la réponse par une approche protéomique. Dans ce cas, un rapprochement avec le Laboratoire d'Hygiène Alimentaire, UMR 1253 STLO, INRA, Agrocampus de Rennes, qui eux utilisent une approche génomique pour étudier les phénomènes d'interaction bactérienne, pourra être envisagé.

II.1.3 Prédiction et quantification de l'effet inhibiteur

Le facteur "flore compétitrice", qu'elle soit endogène ou rajoutée dans le produit, est actuellement assez mal pris en compte par les modèles prévisionnels de croissance bactérienne. Certains auteurs ont montré que la croissance de *L. monocytogenes* s'arrêtait lorsque la flore totale atteignait son niveau maximum (Jameson, 1962). Cependant, ces résultats semblent dépendre de la composition de la flore compétitrice présente. Par exemple lorsque des germes producteurs de bactériocines anti-listeria sont présents, cette théorie n'est pas vérifiée (Duffes *et al.*, 1999 ; Brillet *et al.*, 2004).

Dans le cas où le mécanisme d'inhibition serait lié à la production d'un composé inhibiteur précis, ce qui est possible pour certaines bactéries lactiques, notamment les carnobactéries productrices de bactériocines étudiées depuis dix ans à l'ENITIAA et à l'IFREMER, l'approche modulaire pourra être utilisée pour modéliser la production de ce composé en fonction des conditions environnementales, ainsi que la croissance des germes pathogènes/altérants en fonction de la concentration de ce composé. Ceci permettra de proposer un modèle complet intégrant le paramètre "flore compétitrice".

Dans les autres cas (compétitions...), deux approches sont envisageables : d'une part la souche bioprotectrice peut être étudiée comme un facteur environnemental en tant que tel (la taille de l'inoculum est le facteur de variation) et l'approche modulaire développée peut être testée. D'autre part, en cas de difficulté, des cinétiques de développement des flores pathogènes et altérantes en présence des souches bioprotectrices seront établies directement sur des matrices alimentaires, avec différents facteurs environnementaux. Des modules complémentaires de compétition bactérienne comme ceux proposés par Gimenez et Dalgaard (2004) pourront ainsi être rajoutés au modèle développé.

II.1.4 Application aux produits de la mer à l'échelle pilote

Avec les connaissances acquises, des productions à l'échelle pilote de divers produits de la mer (saumon fumé, saumon frais et crevettes emballés sous atmosphère modifiée...) biopréservés seront élaborées. Outre les suivis microbiologiques, des paramètres biochimiques d'altération (ABVT, TMA, pH, TBA...) ou sanitaires (amines biogènes) ainsi que des critères sensoriels seront suivis, afin de valider cette technologie. L'effet sur les flores pathogènes comme *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. ou *V. parahaemolyticus* sera testé par challenge test. Des ruptures de la chaîne du froid seront simulées afin que les pathogènes mésophiles puissent se développer. Ces expériences demanderont un important travail de mise au point car jusque là, nous n'avons pas travaillé sur d'autres produits que le saumon fumé ni sur certains des pathogènes cités. Nous ne connaissons donc pas leurs conditions et cinétiques d'implantation.

Le travail sur les mécanismes d'inhibition, la modélisation de l'effet inhibiteur et l'application aux produits de la mer a fait l'objet d'une **demande de financement** auprès du **Pôle Agronomique Ouest** (association regroupant la région Pays de Loire et la région Bretagne), avec une application particulière aux crevettes tropicales cuites et au saumon frais emballé sous atmosphère protectrice. Ce projet a été accepté après une première phase de deux ans dédiée à la connaissance des écosystèmes microbiens de la crevette. **Ils démarreront donc fin 2008, pour une durée de deux ans** et seront réalisés en **partenariat avec l'ADRIA de Quimper, l'ENITIAA et des industriels transformateurs des produits de la mer, ainsi qu'un producteur de ferment bioprotecteur.**

Une demande de bourse de thèse , dont une partie du programme porte sur ce sujet, a été déposée à l'IFREMER pour la rentrée 2007. Je prendrais la direction de cette thèse et Marie-France Pilet de l'ENITIAA serait co-encadrante. La partie plus appliquée sera réalisée avec des stagiaires.

II.2 Technologies douces de décontamination : la lumière pulsée

Le traitement d'un produit par la lumière pulsée consiste à le soumettre à un flash lumineux de très forte intensité et de durée extrêmement courte (300 μ s). La lumière est constituée de lumière visible (49%), d'ultra-violets (21%) et d'infra-rouges (30%) et l'intensité du flash est 20 000 fois supérieure à la puissance du rayonnement solaire à la surface de la mer. Il s'agit d'une technologie de décontamination de surface ou de liquides clairs. Le laboratoire de Microbiologie du Froid de l'Université de Rouen travaille sur ce sujet et dispose avec la Plate-Forme Technologique d'Evreux de deux pilotes de lumière pulsée (CLARANOR et LA CALHENE). En association avec Nicole Orange de l'université de Rouen, nous avons proposé une étude de faisabilité de cette technologie pour la décontamination de crevettes décortiquées ou non. **Ce travail sera financé par l'OFIMER (Office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture) pour une durée de 6 mois.**

Si les tests microbiologiques et sensoriels sont concluants, **une deuxième partie plus amont sera proposée**, en association avec l'ENV de Nantes (UMR-INRA 1014/ENV/ENITIAA). Elle portera sur :

- la modélisation des effets du traitement lumière pulsée sur l'inactivation des microorganismes modèles

Les effets du traitement seront déterminés par l'appréciation de la réduction de la population des microorganismes cibles après le traitement par la lumière pulsée. Il s'agira d'obtenir les courbes d'inactivation des microorganismes sélectionnés en fonction des paramètres du traitement. La modélisation des effets du traitement sera effectuée à l'aide de plans expérimentaux en milieu modèle.

Les facteurs de variation du traitement pourront être liés à la technologie elle-même (nombre, durée et énergie des pulses, position et distance par rapport à la lampe, nombre de lampes ...), ainsi qu'aux caractéristiques de la matrice traitée (température, congélation, pH, activité de l'eau ...) et à celles des germes (nombre et état physiologique des bactéries au moment du traitement, effet souche ...).

- la caractérisation physiologique des effets

Il est connu que l'application d'un traitement physique n'aboutit pas systématiquement à la mort de toutes les cellules présentes. Certaines peuvent simplement être endommagées et elles nécessitent un temps de "réparation" pour retrouver leur potentiel altérant ou virulent. Cette phase de réparation a lieu généralement *in situ* durant le stockage. Très souvent, durant cette phase de "réparation" (voire au-delà) les bactéries n'ont plus la capacité à former des colonies sur géloses et échappent à l'investigation microbiologique lors d'autocontrôles par exemple. Afin de déterminer si le traitement par la lumière pulsée aboutit à la mort des cellules ou constitue un endommagement sub-létal permettant la survie des microorganismes, nous pourrions avoir recours à des dosages de marqueurs de souffrance et/ou de mort cellulaire :

- charge énergétique des cellules (concentration cellulaire en ATP)
- intégrité des acides nucléiques après migration sur gel
- double coloration CTC/DAPI. Le CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) se comporte comme un accepteur d'électron et est réduit en un sel de formazan faisant apparaître un précipité rouge dans les cellules viables, visible au microscope à épifluorescence. Le DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) est un fluorochrome intercalant de l'ADN colorant en bleu toutes les cellules.

Les résultats après traitements seront comparés aux résultats obtenus sur une population autoclavée (121°C, 20 minutes) de microorganismes (témoins de mort cellulaire).

II.3 Associations de barrières

L'utilisation combinée de différents traitements inhibiteurs peut permettre de réduire l'intensité de chacun de ces traitements utilisés individuellement tout en garantissant une parfaite maîtrise de développement microbien.

Dans le projet HURDLETECH du SEAFOODplus, il est prévu de tester en association binaire les trois barrières "biopréservation", "lumière pulsée" et "chitosan".

Les chitosans sont obtenus par déacétylation alcaline de la chitine de crustacés. Leur effet antimicrobien est souvent rapporté. Il est lié à la force électrostatique générée entre les groupements protonés NH₂ des chitosans et les charges négatives de surface des bactéries. Les activités inhibitrices de différents chitosans ont été étudiées par l'AZTI dans le projet HURDLETECH. La plupart des germes d'origine

marine (pathogènes et altérants) sont sensibles, sauf les carnobactéries qui au contraire sont plutôt stimulées. Les formulations les plus efficaces ont été retenues pour développer des films bioactifs.

En 2008, il est prévu de tester ces trois barrières, seules ou en association deux à deux, sur la croissance de la flore naturellement présente dans le saumon fumé et sur *L. monocytogenes* ensemencé. Les tests seront réalisés directement dans la matrice saumon fumé et permettront de voir d'éventuelles synergies entre les barrières.

III. QUALITE ET SECURITE DE LA CREVETTE

La France est le premier importateur européen de crevettes, avec environ 100 000 tonnes par an en 2004, ce qui représente le premier poste d'importation des produits de la mer en valeur (533 millions €), devant le saumon (Bilan annuel 2004, Commerce extérieur des produits de la pêche et de l'aquaculture, OFIMER). 82% des importations (Equateur, Thaïlande) concernent la **crevette tropicale** (*Penaeus* spp.), dont les deux-tiers sont des crevettes d'élevage. La plus grosse partie des crevettes tropicales sont importées crues congelées, et sont cuites (décortiquées ou non) par des entreprises locales (plus de 70 % des crevettes destinées à la consommation française) avant d'être vendues en "frais", ou sous atmosphère modifiée pour allongée la durée de vie. Le marché de la crevette cuite réfrigérée est en constante expansion et depuis 2000 la consommation en volume est en croissance de plus de 20% par an, probablement en liaison avec l'attraction que représentent les produits de la mer du fait de leur haute valeur nutritive et de l'image positive pour la santé dont ils jouissent auprès des consommateurs.

Dans ce contexte économique, **un projet de recherche sur la crevette est devenu une priorité pour l'IFREMER**, qui intègre tous les maillons de cette filière, de la production (aquaculture et pêche) jusqu'à la transformation. Le département STAM souhaite se positionner sur la partie transformation, qualité et sécurité qui pourrait générer un projet ambitieux et fédérateur pour STAM, nécessitant à la fois des compétences en microbiologie, biologie moléculaire, biochimie, technologie et analyse sensorielle.

Les crevettes cuites, décortiquées ou non, sont **très fragiles d'un point de vue microbiologique** car elles présentent des propriétés physico-chimiques et biochimiques permettant le développement rapide des bactéries : pH neutre, Aw élevée, éléments nutritifs facilement assimilables, notamment grande quantité d'azote non protéique et de nucléotides. Les DLC de ces produits, sans conservateur, n'excèdent pas 7 jours, même lorsqu'ils sont emballés sous atmosphère protectrice. Curieusement, il existe très **peu de données bibliographiques sur la microbiologie de ces produits**. Lors de la cuisson des crevettes, la flore de contamination est considérablement réduite, mais durant le refroidissement en bains et les étapes de manutention pour le décorticage et l'emballage, les produits sont recontaminés, souvent par une microflore à Gram positif (Harrison et Lee, 1968). Cette constatation est corroborée par l'étude récente de Mejlholm *et al.* (2005) qui ont montré que la flore totale de crevettes cuites décortiquées emballée sous atmosphère modifiée pouvait dépasser 10^8 UFC/g au moment de l'altération sensorielle et qu'elle était dominée par les bactéries lactiques

(notamment des carnobactéries) et des *Brochothrix thermosphacta*. Cependant ces travaux portaient sur de la crevette d'eau froide, et très peu d'études portent sur la crevette tropicale. A notre connaissance, seule les études de Dalgaard et Jorgensen (2000) et Dalgaard *et al.* (2003) ont porté sur ce produit. Toutes deux montrent que les bactéries lactiques, notamment *Carnobacterium* spp. et *Enterococcus* spp. sont nombreuses sur ce type de produit et probablement responsables de l'altération sensorielle.

Des travaux en cours au département STAM et à l'ENITIAA indiquent que la flore de crevettes tropicales cuites décortiquées est très variable selon les lots analysés, et qu'elle comporte un mélange de bactéries lactiques, de *Brochothrix*, d'entérobactéries et de bactéries productrices d'H₂S. A ce stade, il est difficile de préciser le rôle de l'origine de la matière première et de l'hygiène en entreprise dans l'altération finale du produit, mais il est sur que la **contamination est variable selon les usines**.

Les crevettes fraîches peuvent être contaminées par des germes pathogènes tels que *Salmonella* (Dalgaard *et al.*, 1995), notamment dans les élevages, et *Vibrio parahaemolyticus* (Dalgaard *et al.*, 1995 ; Gopal *et al.*, 2005) qui est une bactérie que l'on trouve régulièrement dans la plupart des eaux côtières tropicales et des estuaires du monde entier, aux saisons chaudes. De même à l'état cuit, les crevettes peuvent être re-contaminées par des germes pathogènes tels que *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* provenant de contaminations croisées (communication de l' A3C "Association des Cuiseurs de Crevettes"). Par ailleurs, les données de la DSV 49 montrent qu'entre 2001 et 2004, les crevettes représentent 40 à 60% des alertes enregistrées pour l'ensemble des produits de la pêche.

Basé sur ce bref état de l'art, le projet pourrait comprendre les points suivants :

III.1 Qualité des crevettes

- étude des écosystèmes microbiens complexes, variabilité selon le procédé de transformation, la saison, l'usine... Une thèse (Emmanuel Jaffrès) est actuellement en cours, dirigée par X. Doussset (ENITIAA) et J.J. Joffraud (IFREMER). Cette thématique permet de mettre en place et pérenniser au laboratoire des techniques de biologie moléculaire pour l'identification des bactéries pour et l'étude des écosystèmes microbiens complexes en s'affranchissant des milieux de culture (TTGE).
- détermination des flores spécifiques d'altération (lien avec les composés volatils et l'analyse sensorielle). L'allongement de la DLC des crevettes (basée sur des aspects purement sensoriels) n'a pas été corrélé aux dénombrements microbiens testés. Il est donc indispensable de déterminer quels germes sont spécifiquement responsables de la détérioration gustative afin de disposer de traceur de l'altération
- influence des paramètres environnementaux sur la qualité (température, pH, aw, atmosphère modifiée, conservateurs, ...) cf § I.2
- mise en place d'indices microbiologique et/ou biochimiques de qualité actuellement inexistantes
- Qualité organoleptique, définition d'une grille de cotation sensorielle

III.2 Analyse du risque sanitaire

- Identification des dangers et des voies de contaminations. Ce travail nécessitera la mise en place de technique d'identification fine des bactéries (niveau souche) comme l'électrophorèse en champ pulsé
- Etablissement de modèles de croissance en fonction des paramètres environnementaux (cf § I.2)

III.3 Maîtrise de la qualité et sécurité

- Technologies barrières (notamment biopréservation), cf § II.1
- Technologies de décontamination (notamment lumière pulsée), cf § II.2
L'ionisation est également pratiquée par les industriels et pourrait être étudiée.

Ce projet pourrait également intégrer d'autres aspects tels que :

- **Utilisation de peptides antimicrobiens** comme substituts aux antibiotiques et antiviraux dans les élevages (J.P. Bergé, cadre de recherche au département STAM, travaille sur les peptides antimicrobiens générés à partir de co-produits d'origine marine. Nous collaborons déjà pour caractériser les effets antimicrobiens de certains hydrolysats de co-produits de poisson).
- **Traçabilité des espèces** (V. Verrez du D^{pt} STAM travaille sur la diagnose moléculaire)
- **Développement d'outil pour le tri en ligne** (calibre, mue). (M. Mastail du D^{pt} STAM).
- **Etablissement d'un référentiel qualité organoleptique** : espèces, origines, off flavours non liée à des problèmes microbiologiques (M. Cardinal du D^{pt} STAM travaille en analyse sensorielle).

Ce travail ne pourra être réalisé sans le concours de nombreux partenaires et l'apport de financements. C'est pourquoi des contacts sont actuellement pris avec des laboratoires au Danemark, au Portugal et en Espagne pour monter un projet à l'échelle européenne dans le cadre du 7^{ème} PCRD.

IV. CONCLUSION

Pour conclure, **ce projet ouvre de nombreuses perspectives**, concernant à la fois :

- **l'acquisition/développement de nouvelles méthodologies** et de nouvelles connaissances (microbiologie prévisionnelle, analyse du protéome, mécanismes de stress, biologie moléculaire)
- **la poursuite de travaux appliqués** : extension à d'autres matrices alimentaires que celle jusque là étudiée, combinaison des différentes barrières, actuellement peu étudiée.
- **la valorisation industrielle** de nos travaux. Nous sommes actuellement à la recherche de partenaires industriels intéressés pour participer à des projets de démonstration, notamment dans le domaine de la biopréservation. Nous cherchons à impliquer aussi bien des producteurs de ferment que des

transformateurs des produits de la pêche (fumeurs de saumon, cuiseurs de crevettes...) afin de vérifier les potentialités de nos souches. Des demandes de financement auprès de l'Europe seront faites dans le cadre du SEAFOODplus (projets de démonstration) ou dans le cadre du 7^{ème} PCRD (collaborative projects, ERA-SME projects).

Certaines souches peuvent également être valorisées dans d'autres domaines d'application. Des contacts sont en cours avec une société qui souhaite tester nos bactéries psychrophiles pour développer des systèmes indicateurs de temps-température.

La qualité de notre approche scientifique et des réponses que l'on pourra proposer aux questions posées est validée par le financement en partie acquis sur certaines actions, aussi bien au niveau régional, inter-régional et européen, ainsi que par les projets contractualisés avec la profession.

Les forces nécessaires à la réalisation de ce projet doivent être complétées par la présence d'étudiants en thèse ou en stage post-doctoraux.

Une demande de **bourse de thèse dont je prendrais la direction** a été déposée à l'IFREMER pour la rentrée 2007.

Des contacts sont actuellement pris avec le Québec (INAF-Université Laval à Québec et CTPA à Gaspé) pour déposer un projet auprès CRSNG en 2007 qui nous permettrait de recevoir un étudiant en stage post-doctoral.

Au delà des projets mentionnés, les perspectives de recherche à plus long terme devront évoluer en fonction des plans stratégiques quadriennaux de l'IFREMER.

Quelques **mots clés** concernant spécifiquement mon domaine d'action : microbiologie des produits de la mer, qualité et sécurité, technologies de décontamination, biopréservation, écologie microbienne, microbiologie prévisionnelle.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arrhénius, S. 1889.** Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohzucker durch säuren. Zeit. Chem. 4, 226,248.
- Augustin J.C. and Carlier V., 2000 a.** Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 56, 29-51.
- Augustin J.C. and Carlier V., 2000 b.** Modelling of the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interaction between environmental factors. Int. J. Food Microbiology. 56, 53-70.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A., 1995.** Mathematics of predictive food microbiology. Int. J. Food Microbiol. 26, 199-218.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Bouttefroy, A. and Leroi, F., 2004.** Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. J. Appl. Bacteriol. 97, 1029-1037.
- Camilli A, et Bassler BL, 2006.** Bacterial small-molecule signaling pathways. Science. 311(5764), 1113-6.
- Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet, N., Serot, T. and Delignette-Muller, M.L., 2006.** Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. Int. J. Food Microbio. 106, 159-168.
- Dalgaard, A., Huss H. H., Kittikun A. and Larsen J. L., 1995.** Prevalence of *Vibrio cholerae* and

- Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 28,101-113.
- Dalgaard, P. and Jorgensen L. V., 2000.** Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf life >7months at 0°C, but spoil in 4-6 days at 25°C. *Int. J. Food Science Technol.* 35, 341-442.
- Dalgaard, P. and Koutsoumanis, K., 2001.** Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *J. Microbiol. Methods.* 43, 183-196.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. and McMeekin, T.A., 1994.** Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 391-404.
- Dalgaard, P., Vancanneyt M., Euras Vilalta N., Swings J., Fruekilde P., and Leisner J. J., 2003.** Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. *J. Appl. Microbiol.* 94, 80-89.
- DeKeersmaecker S.C.J. et Vanderleyden J., 2003.** Constraints on detection of autoinducer-222 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiol.* 149, 1953-6.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P., 1999.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 62, 1394-1403.
- Gimenez, B. and Dalgaard, P., 2004.** Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96, 96-109.
- Gompertz, B. 1825.** On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of Life Contingencies. *Trans. R. Philos. Soc.* 115, 513-585.
- Gopal, S., Otta S. K., Kumar S., Karunasagar I., Nishibuchi M., and Karunasagar I., 2005.** The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 151-159.
- Harrison, J.M. and Lee J.S., 1968.** Microbial evaluation of Pacific Shrimp Processing. *Appl. Microbiol.* 18, 188-192.
- Jameson, J.F., 1962.** A discussion of the dynamics of salmonella enrichment. *J. Hygiene, Cambridge* 60, 193-207.
- Joffraud, J.J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J.S., Léon, S., Gigout, F. and Leroi, F., 2006.** Effect of bacterial interactions on the spoilage of col-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 51-61.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F. and Cardinal, M., 1998.** Study of the microbial ecology of cold smoked salmon during storage at 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 111-121.
- Lodge, R.M. and Hinshelwood C.N., 1943.** Physiological aspects of bacterial growth. Part IX. The lag phase of *Bact. lactis aerogenes*. *J. Chem. Society.* 288, 213-219
- Mafart, P., 2005.** Food engineering and predictive microbiology : on the necessity to combine biological and physical kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 239-251
- Mejlholm, O., Boknaes N., and Dalgaard P., 2005.** Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *J. Appl. Microbiol.* 99, 66-76.
- Membré, J.M., Thurette, J., and Catteau, M., 1997.** Modeling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 1997, 82, 345-350.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. and Ball, A., 1982.** Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures . *J. Bacteriol.* 149, 4-5.
- Richards, F.J., 1959.** A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.* 10, 290-300.
- Ross, T., 1996.** Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 501-508.
- Schaffner, .W. and Labuza, T.P., 1997.** Predictive Microbiology : where are we and where are we going ? *Food Technol.* 51, 95-99.
- Sérot, T., Baron, R., Knockaert, C. and Vallet, J.I., 2004.** Effect of smoking processes on the contents of 10 major phenolic compounds in smoked fillets of herring (*Cuplea harengus*). *Food Chem.* 85, 111-120.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M. and Leroi, F., 2001.** Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 34, 797-806.
- Zwietering, M.H., Jogenburger, I., Rombouts, F. M. and Riet, K., 1990.** Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Microbiol.* 56, 6, 1875-1881.