



République Algérienne Démocratique et Populaire



Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Présenté par

TOURE IBRAHIMA

DJELLOULI FATIMA ZOHRA

Pour l'obtention du diplôme de

Master ACADEMIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Étude des *Pseudomonas* psychrotrophes
responsables d'altération des produits
alimentaires réfrigérés**

Soutenue publiquement le 30/Juin/2020

Président	M. CHERIGUENE Abdrahim	Pr	U. Mostaganem
Encadreur	M. DJIBAOUI Rachid	Pr	U. Mostaganem
Examineur	M. TAHRI Miloud	MCB	U. Mostaganem

Remerciement

Avant toute chose, nous tenons à remercier **DIEU** le tout puissant qui nous a donné la force et le courage pour achever ce travail.

En guise de reconnaissance nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin au bon déroulement et à l'élaboration de ce modeste travail.

Nos sincères gratitudes à **M. DJIBAOUI Rachid** pour la qualité de son encadrement, ses conseils et son intérêt incontestable qu'il porte à nos égards malgré cette période si difficile de la pandémie covid-19.

Nous exprimons également toute notre gratitude aux membres du jury **M. CHERIGUENE**

Abderrahim (président) et **M.TAHRI Miloud** (examinateur) qui ont accepté avec joie de prendre part.

Nous remercions également à tous ces braves hommes et femmes qui sont sur la première ligne pour faire face à cette pandémie (covid-19) dont nous comptons participer à la résolution.

Enfin, nous n'oserons oublier de remercier tout le corps professoral du département de biologie pour le travail énorme qu'ils ont effectué pour nous créer les conditions favorables pour le bon déroulement de notre mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chers (es) frères et sœurs pour leurs appui et leurs encouragement permanents, et leurs soutien moral,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

A tous mes amis (Cissé Anselme, Dansoko Siriman, Diarra Gaoussou, Touré Alassane Youssouf, Traoré Adama, Traoré Balla Moussa...), a Djellouli Fatima Zohra mon binôme ainsi que toutes les autres étudiantes de la 2eme année master microbiologie appliquée pour leurs considération en ma modeste personne.

Touré Ibrahima

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit, ton amour me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force.

A mon très cher père, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'accompagner, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes très chers frères et sœurs qui sont toujours à mes côtés qui m'encourage et me soutien toujours. Puisse DIEU vous donne la santé, le bonheur et surtout la réussite.

Djellouli Fatima Zohra

SOMMAIRE

Liste des figures :	8
La thermorésistance de protéinases produites par des microorganismes isolés est suffisamment grande pour résister pleinement à un traitement UHT.	10
Mots clés : Bactéries psychrotrophes ; réfrigération ; abattage ; protéinase ; organoleptique ; thermorésistance.	10
I.1 Définition et Historique de la conservation par le froid :	15
I.1.1 Principe du froid :	15
I.2 La conservation de la viande par réfrigération :	16
I.2.1 Intérêt de l'utilisation du froid :	16
I.3 Les principales techniques de réfrigération	17
I.3.1 La réfrigération lente :	17
I.3.2 La réfrigération rapide :	17
I.3.3 La réfrigération ultra-rapide :	17
I.3.4 La réfrigération complexe :	17
I.4 ASPECTS TECHNOLOGIQUES DE LA CHAÎNE DU FROID :	18
I.4.1 Importance technologique de la conservation des aliments au froid :	18
I.5 Spécificités de la chaîne du froid selon les aliments :	21
I.5.1 Viande :	21
I.5.2 Poisson :	21
I.5.3 Fruits et légumes :	22
I.5.4 Lait et produits laitiers :	23
I.6 Organisation technologique de la chaîne du froid :	23
I.6.1 Entreposage :	23
I.6.2 Transport :	24
I.6.3 Distribution :	24
I.6.4 Consommation domestique :	25
I.7 Intérêt de la conservation des aliments par réfrigération :	25
I.7.1 Le domaine du froid s'étend de +12°C à -45°C environ	26
I.8 CONCLUSION :	26
CHAPITRE II :	27
CHAPITRE II :	27
II.	28
II.1 Introduction :	28
II.2 Définition, caractéristiques et classification des bactéries psychrotrophes :	28
II.2.1 DÉFINITION DES BACTÉRIES PSYCHROTROPHES :	28
II.3 Les bases métaboliques :	29
II.4 Les principales bactéries psychrotrophes :	30

II.4.1	Les agents de toxi-infections alimentaires :.....	30
II.4.2	Agents d'altérations des aliments :.....	30
II.5	Caractéristiques physiologiques des bactéries psychrotrophes :	31
II.5.1	Courbe de croissance :	31
II.5.2	Sensibilité à la chaleur :.....	32
II.5.3	Autres caractéristiques importantes :.....	32
II.6	Importance pratique des bactéries psychrotrophes :	32
II.6.1	Les bactéries psychrotrophes agents de toxi-infections alimentaires :.....	32
II.7	Principaux facteurs de risque :	35
II.8	Influences des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées :	35
II.8.1	Protéolyse et lipolyse :	35
II.8.2	Autres types d'altérations :	36
II.8.3	Applications à la maîtrise de la qualité et de la salubrité des denrées réfrigérées :	37
II.9	Maîtrise des sources de contamination :	37
II.9.1	ASSAINISSEMENT :.....	38
II.9.2	RÈGLES DE RÉFRIGÉRATION :	38
II.9.3	EMPLOI DE CONDITIONNEMENTS PARTICULIERS :.....	39
II.9.4	Choix raisonné de la durée de vie commerciale des produits :	39
	PARTIE EXPERIMENTALE.....	41
III.....		41
III.1	MATERIELS ET METHODES :	41
III.1.1	Objectifs :.....	42
III.1.2	La flore psychrotrophe des carcasses de volailles.....	43
III.1.3	DISCUSSION	51
III.2	Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle	54
Matériel et méthodes :		54
III.2.1	Echantillons :	54
III.2.2	Analyse :	54
III.2.3	RESULTATS :.....	55
III.2.4	DISCUSSION :.....	59
III.3	Thermorésistance des bactéries psychrotrophes du lait cru et de leurs protéinases : ..	61
III.3.1	Isolation et identification de micro-organismes protéolytiques psychrotrophes :.....	61
III.3.2	Production, isolation et purification partielle de protéinases bactériennes thermostables :	61
III.3.3	Chauffage de suspensions bactériennes :	62
III.3.4	Chauffage des solutions d'enzymes protéolytiques :.....	62
III.3.5	Détermination de l'activité protéolytique :.....	63

III.3.6	RESULTATS ET DISCUSSION :	63
	Conclusion Générale :	71
III.4	Conclusion Générale :	72
III.5	Bibliographie :	75
3.	Cécille Labelle C, Meurier C, Marie Thérèse., (1972), La flore psychrotrophe des carcasses de volailles Evolution aux différents postes d'une chaine d'abattage. Annales de recherches vétérinaires, INRA. Editions, 3 (3), pp.421-434.	75
4.	Dumont J.P, Delepau G, Miguot B, Adda. J (1977)Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâtes molle. Le lait, (569-570), pp 619-630.	75
	Annexe 1 :	81
	PCA (Plate Count Agar):	81
•	King A:	81
•	King B :	81
•	Coloration de Gram :	81

Liste des tableaux :

Tableau 1 : principaux microorganismes de toxi-infections alimentaires en cas de non-respect de la chaîne du froid. (Amat-Rose J.M, 1997)	19
Tableau 2 : réactions de quelques micro-organismes à des températures clés (THIERRY Laugier, 2007).....	26
Tableau 3 : Classification des micro-organismes selon leur température optimale de croissance.....	29
Tableau 4 : Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes. Rosier F. (1995). 36	
Tableau 5 : Principaux procédés permettant un assainissement des denrées alimentaires vis-à-vis des flores psychrotrophes. (Rosser R, 1974)	37
Tableau 6 : Correspondance entre les lieux de prélèvement et les postes étudiés sur la chaîne d'abattage	45
Tableau 7 : Evolution quantitative de la flore psychrotrophe en fonction des postes.....	46
Tableau 8 : Répartition par types des souches isolées en fonctions des postes.....	47
Tableau 9 : Evolution quantitative de la flore psychrotrophe en fonction des postes (par 1 cm ² de peau). En (3°C pendant 3 semaines)	49
Tableau 11 : Analyse du lait cru	56
Tableau 12 : Analyse des fromages sortie saumure	56
Tableau 13 : Analyse des fromages sortie à 35j.....	56
Tableau 14 : Résultat globale concernant la texture et le goût du lait	57
Tableau 15 : Composés mono carbonyles totaux pour 100 g de fromage.	58
Tableau 16 : Indice d'acidité de la matière grasse (ml NaOH 0.01 N/g)	59
Tableau 17 : Acide gras libres (µeq acide palmitique pour 5g de fromage).	59
Tableau 18 : paramètres cinétiques pour l'inactivation thermique des cellules entières de <i>Pseudomonas</i> P 104 et <i>Flavobacterium</i> P 108. (Kaufmann et Cogna, 1954).	65

Liste des figures :

Figure 1 : Le trépied frigorifique de Monvoisin (chaîne du froid, conservation des aliments, produits réfrigérés et congelés) (Monvoisin, 2017).....	19
Figure 2 : Les étapes de la préparation des dilutions décimales.....	42
Figure 3 : Evolution quantitative des flores Psychrotrophe en fonction des postes Etudiés	50
Figure 4 : Analyse chromatographique correspond aux méthyl cétone. (Dumont J.P. 1977).	58
Figure 5 : Inactivation thermique des souches de <i>Pseudomonas</i> P 104	64
Figure 6 : Inactivation de la souche <i>Flavobacterium</i> P 108.....	65
Figure 7 : Inactivation thermique de la protéine P 104	67
Figure 8 : Inactivation de protéinase P 108.....	68
Figure 9 : Inactivation thermique des protéinases P 104 et P 108	69

Liste des abréviations :

A : après

Da : dalton,

DLC : date limite de consommation,

DLUO : date limite d'utilisation optimale,

ES : extrait sec,

Eau/ESD : rapport d'eau et extrait sec à la fin d'affinage,

GS : rapport gras/sec,

HPS : Heat Shock Proteins,

INCA : individuelle et nationale sur les consommations alimentaires,

L/H : litre par habitant,

MG : teneur en matière gras,

NA : Nutrient Agar,

NaCl : chlorure de sodium (natrium),

NaOH : hydroxyde de sodium,

NF : Norme française,

Nm : nanomètre,

PCA : Plate Count Agar,

TIAC : Toxi-infections Alimentaires collectives,

URT : Uranium de retraitement,

UHT : Ultra-Haute-Température

µm : micromètre,

RESUME

L'évolution de la flore microbienne psychrotrophe au cours d'une conservation réfrigérée à basse température a été étudiée sur trois denrées alimentaires différentes à savoir (carcasses de volailles, fromages et lait), selon trois travaux provenant des différents laboratoires.

Dans la première étude **Meurier et al., 1972** ont énuméré la flore psychrotrophe des carcasses de volailles dans un abattoir industriel à breton commercialisant du poulet éviscéré frais. Les prélèvements effectués par écouvillonnage de la flore a permis de mettre en évidence sa diminution de la population des carcasses après l'échaudage et le passage dans la cire, ensuite son augmentation après la plumaison, l'éviscération et au cours des manipulations réalisées en fin de la chaîne.

Dans la même étude une analyse qualitative des germes psychrotrophes rencontrés dans les carcasses de volaille a été présentée. Cette étude a abouti à l'isolement et l'identification de 2591 souches qui ont permis de souligner l'importance capitale des conditions d'hygiène au cours de l'éviscération et de la finition des carcasses. C'est à ces postes que le nombre des *Pseudomonas* augmente de façon très importante.

Selon **Dumont et al. 1977**, une étude a été réalisée sur l'influence de la contamination du lait par des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromage à pâtes molles, en plus d'une lipolyse accentuée, il a été constaté une très forte augmentation des teneurs en méthylcétones et en alcools secondaires. La dégradation des protéines semble s'arrêter à un état intermédiaire comme en témoigne l'amertume observée.

Et enfin l'étude de **Mottar, (1984)** sur deux souches de bactéries psychrotrophes gram (-) *Pseudomonas* P 104 et *Flavobacterium* P 108, qui sont capables de produire des protéinases exocellulaires extrêmement thermostables, sont isolées de lait de mélange réfrigéré.

La thermorésistance de protéinases produites par des microorganismes isolés est suffisamment grande pour résister pleinement à un traitement UHT.

Mots clés : Bactéries psychrotrophes ; réfrigération ; abattage ; protéinase ; organoleptique ; thermorésistance.

ABSTRACT

The evolution of psychrotrophic microbial flora during refrigerated storage at low temperatures was studied on three commodities namely different foods (poultry carcasses, cheeses and milk), according to three studies from different laboratories.

In the first study Meurier et al., 1972 have enumerated the psychrotrophic flora of poultry carcasses in an industrial slaughterhouse in Brittany marketing fresh gutted chicken. The samples taken by swabbing the flora made it possible to highlight its decrease in the population of carcasses after scalding and the passage through the wax, then its increase close to plucking, evisceration and during the manipulations carried out at the end of the chain.

In the same study, a qualitative analysis of psychrotrophic germs encountered in poultry arches was presented. This study resulted in the isolation and identification of 2,591 strains, which highlighted the critical importance of hygienic conditions during the gutting and finishing of carcasses. It is at these posts that the number of *Pseudomonas* increases very significantly.

According to Dumont et al. 1977, a study was carried out on the influence of the contamination of milk by psychrotrophic bacteria on the organoleptic qualities of soft cheese, in addition to an accentuated lipolysis, it was noted a very strong increase in the contents in methyl ketones and secondary alcohols. The degradation of seed proteins stops at an intermediate state as evidenced by the bitterness observed.

And finally Mottar's study (1984) on two strains of psychrotrophic bacteria gram (-) *Pseudomonas* P 104 and *Flavobacterium* P 108, which are capable of producing extremely thermostable exocellular proteinases, are isolated from refrigerated mixed milk.

The heat resistance of proteinases produced by isolated microorganisms is high enough to fully resist UHT treatment.

Keywords: Psychrotrophic bacteria; refrigeration; slaughter; proteinase; organoleptic; thermoresistance.

Introduction générale

Introduction générale :

Aujourd'hui il existe différentes techniques utilisées pour conserver les aliments. Chaque technique de conservation a pour but de préserver l'aliment et de ralentir ou stopper sa détérioration. Dès la première civilisation, les hommes ont cherché et ont trouvé des solutions de conservation pour éviter la prolifération des bactéries, mais de nos jours la conservation des aliments a connu de nouvelles méthodes très modernisées d'où parmi eux figure la réfrigération. La flore microbienne rencontrée sur la peau des volailles, immédiatement après leur abattage, est constituée d'espèces très diverses ; son hétérogénéité a été montrée par de nombreux auteurs (**Gunderson et Fadden, 1954**), Ultérieurement, au cours des opérations qui suivent l'abattage, les conditions d'environnement provoquent une sélection parmi les germes susceptibles de se développer. **Barnes et Thornley 1966** ont montré qu'après entreposage sous réfrigération, le nombre des germes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Achromobacter* augmentait de façon importante et que ces germes constituaient 90 à 95% de la flore psychrotrophe au moment de l'apparition de l'odeur caractéristique de la putréfaction. Par ailleurs, **Clark et Lentz, 1969** ont observé que les *Pseudomonas* étaient apportés au cours des opérations d'abattage et que leur nombre s'accroissait considérablement après l'éviscération et aussi après le refroidissement par trempage dans la glace.

L'étude s'est porté d'une part sur le dénombrement de la flore psychrotrophe des aliments (carcasse de volaille ; fromage et le lait) réfrigérés. Il a donc semblé utile d'étudier la flore psychrotrophe des volailles préparées dans une usine en vue de la vente à l'état frais, à un double point de vue :

- évolution quantitative de cette flore aux différents postes de la chaîne d'abattage en fonction des opérations effectuées ;
- détermination de l'importance relative des différentes espèces qui nuisent le plus à la conservation.

Ensuite une collecte de laits refroidis et son utilisation de plus en plus présentant souvent de mauvaise qualité bactériologique à poser de graves problèmes à l'industrie laitière. Une des conséquences de la conservation du lait à basse température a été étudié pour voir le développement d'une flore psychrotrophe susceptible non seulement de modifier l'aptitude du lait à la coagulation et de rendre plus difficile la croissance des levains lactiques mais aussi de provoquer des défauts organoleptiques majeurs en raison de la production d'enzymes

lipolytiques et protéolytiques qui pour certaines d'entre elles résistent à la pasteurisation (**Dumont et al., 1974**).

CHAPITRE I : Généralité sur la réfrigération et son intérêt

CHAPITRE I. Généralité sur la réfrigération et son intérêt :

I.1 Définition et Historique de la conservation par le froid :

Le froid doit son pouvoir de conservation à un effet thermique d'abaissement des vitesses de réactions biologiques de développement (métabolisme des microorganismes) et des réactions biochimiques et enzymatiques qui peuvent aussi nuire à la conservation des aliments. (AMROUCHE, 2010). Dans l'antiquité, les Scandinaves utilisaient le sol gelé pour conserver des aliments pendant plusieurs mois. Les chinois et les Arabes se servaient de la neige pour faire de même. Un peu plus tard, les Romains utilisaient la glace pour transporter leurs marchandises à travers tout l'empire romain.

La congélation « moderne » remonte à 1929, lorsqu'un ingénieur américain, **Clarence Birdseye**, a déposé le brevet de la congélation rapide. Cette technique fut ensuite utilisée pour transporter les marchandises entre l'Europe et le continent américain, comme pour le ravitaillement des armées pendant la seconde guerre mondiale. En 1960, le grand public découvrit les poissons surgelés (**Khaled, 2009**). L'application du froid sur les denrées alimentaires représente la technique de conservation la plus utilisée depuis bien longtemps, De nos jours les techniques de refroidissement constituent la base du secteur des industries agricoles et alimentaires étant donné que 45% des produits consommés sont vendus sous régime de froid (**Commère et Billard, 1999**).

I.1.1 Principe du froid :

Le froid, et plus particulièrement la réfrigération, constitue l'un des moyens pour limiter la croissance bactérienne dans les denrées alimentaires et ainsi prolonger leur délai de consommation. Pour être pleinement efficace, le froid est à appliquer, à températures convenables (le plus possible voisine de 0°C), de manière précoce et continue sur l'aliment, depuis sa production jusqu'à sa consommation finale. Cette nécessité de continuité détermine le concept, maintenant classique, de chaîne du froid, la résistance de l'ensemble du processus étant déterminée par celle de l'étape – ou maillon – la plus fragile. L'examen des problèmes spécifiques à chaque étape de la chaîne du froid montre que le respect de la chaîne du froid dépend essentiellement du renforcement des deux derniers maillons : distribution, et surtout consommation familiale.

A l'égard des microorganismes, la réfrigération agit en ralentissant leur multiplication, sans la stopper pour autant. Mais, si le recours au froid a permis d'accroître la sécurité alimentaire à l'égard des grands germes pathogènes ou d'altération, la vigilance doit être maintenue. En effet la généralisation de l'utilisation du froid a permis l'émergence de « nouveaux » germes, les

psychrotrophes et les psychrophiles. Ces microorganismes sont, si le temps le leur permet, capables de se multiplier à des températures proches de 0°C et d'avoir ainsi une incidence néfaste sur la santé du consommateur. Les outils mathématiques, comme les logiciels de modélisation, restent à perfectionner pour définir des délais de consommation en relation avec les conditions réelles de développements de bactéries dans l'aliment. Toutefois l'émergence de ces problèmes ne doit en aucun cas récuser le recours au froid en agroalimentaire dont l'utilité tant technologique que sanitaire est vérifiée chaque jour (**Anonyme, 2007**)

La réfrigération consiste à refroidir puis entreposé les aliments à une température basse, proche du point de congélation, mais toujours positive par rapport à celui-ci. Généralement, la température de réfrigération se situe aux alentours de 0°C. A ces températures, la vitesse de développement des microorganismes contenus dans les aliments est ralentie. La réfrigération est utilisée pour la conservation des aliments périssables à court et moyen terme. La durée de conservation va de quelques jours à plusieurs semaines suivant le produit, la température, l'humidité relative et le type de conditionnement.

Exemple de la durée de conservation de certains aliments par la réfrigération :

- Pommes : -1 à 5°C entre 3 à 8 mois ;
- Abricot : 0°C entre 1 à 2 semaines ;
- Haricot vert : 5 à 7°C entre 7 à 10 jours
- Melons : 0 à 10°C entre 5 jours à 6 semaines ;

Des règles fondamentales (trépied frigorifique) doivent être respectées dans l'application du froid pour conserver de façon optimale les qualités des produits réfrigérés : la réfrigération doit être faite le plus tôt possible après collecte, elle doit s'appliquer à des aliments initialement sains et être continue tout au long de la filière de distribution (notion de chaîne du froid).

I.2 La conservation de la viande par réfrigération :

I.2.1 Intérêt de l'utilisation du froid :

La réfrigération, qui est une conservation au froid des aliments périssables, notamment la viande, a pour effet la diminution de l'activité des bactéries en retardant leur prolifération. La majorité des microorganismes tels que les coliformes fécaux et les germes pathogènes responsables d'intoxications alimentaires ne sont plus capables d'activités métaboliques à des températures inférieures à 5°C. Cet abaissement de la température est aussi indispensable pour contrôler les propriétés organoleptiques post mortem de la viande (tendreté, flaveur et couleur). Ce mode de conservation ne peut en général excéder quelques jours, de l'ordre de deux à trois

jours pour les viandes fraîches. (Van Breker B et al., 2005)

L'utilisation du froid pour la conservation des aliments périssables est sans contester la technique la plus répandue. Les basses températures permettent de conserver un produit pendant un temps plus ou moins long et pouvant être consommé avec sécurité tout en gardant son aspect, sa couleur, ses qualités, gustatives, nutritives et hygiéniques. (Caplet C., 1966),

I.3 Les principales techniques de réfrigération

I.3.1 La réfrigération lente :

Il était indispensable surtout au début de la chaîne de fabrication des viandes hachées. Où dans les grandes chambres frigorifiques la vapeur d'eau qui se dégage des carcasses chaudes qu'on vient d'introduire va se condenser à la surface de ces dernières une fois refroidies, pour cela il faut utiliser des températures de l'ordre de 0°C pendant 48 heures pour atteindre une température de +2°C au cœur des carcasses ou 72 heures pour atteindre une température de 0°C au cœur des carcasses. Craplet C., (1966),

I.3.2 La réfrigération rapide :

Elle a pour but de freiner la prolifération microbienne et de limiter la perte de poids par évaporation. La méthode de réfrigération consiste à introduire les carcasses encore chaudes directement dans une chambre froide, parcouru par un courant d'air. On arrive au bout de quelques heures. (3 à 4 heures) à baisses la température superficielle de la viande vers 2°C ou 3°C. (Gatti E, 1988),

I.3.3 La réfrigération ultra-rapide :

Un dispositif de refroidissement par radiation et convection naturelle en faisant passer les carcasses entre des refroidisseurs à plaques cela fait passer la température ou "cœur" de +41°C à +3°C en 18 heures avec très faible perte par évaporation. (Craplet C, 1966),

I.3.4 La réfrigération complexe :

Dans la réfrigération lente, pour diminuer les pertes par évaporation, on peut augmenter le degré d'humidité de l'air froid, et empêcher le développement des microbes psychrophiles par l'un des moyens suivants : l'ozone, le gaz carbonique, le rayon ultra-violet et l'utilisation d'antibiotique. (Djikaoua et Bouhafs, 2007)

I.4 ASPECTS TECHNOLOGIQUES DE LA CHAÎNE DU FROID :

I.4.1 Importance technologique de la conservation des aliments au froid :

A l'égard des aliments le froid agit essentiellement en retardant l'apparition des phénomènes d'altération et en ralentissant la multiplication microbienne, notamment pour les microorganismes pathogènes. De ce fait le recours au froid permet d'allonger la durée de vie des denrées alimentaires et d'accroître la sécurité sanitaire. Cela correspond à des effets bénéfiques pour tous les acteurs, du fabricant au consommateur final, en leur permettant, entre autres, une plus grande souplesse dans la gestion des produits. Ainsi, aujourd'hui, la grande majorité des denrées alimentaires passent, avant leur consommation, par au moins une étape de réfrigération ou de congélation : pour la seule étape de la distribution, 45% des aliments consommés en France sont mis en vente sous régime du froid, soit 23 millions de tonnes pour un chiffre d'affaire d'environ 54 milliards d'Euros. (**Commère, 1998**)

Définis par **Alexandre MONVOISIN (1928)**, les principes fondamentaux de l'application du froid à la conservation des denrées périssables sont énoncés sous le vocable de « trépied frigorifique de MONVOISIN » :

I.4.1.1 Application du froid sur des produits sains :

La réfrigération ayant comme conséquence le ralentissement des phénomènes d'altération et de multiplication microbienne, il est essentiel que les aliments soient initialement d'excellente qualité et peu contaminés.

I.4.1.2 Précocité :

Le froid est à appliquer aussitôt que possible après l'abattage ou la récolte, avant que les diverses altérations n'aient commencées.

I.4.1.3 Continuité :

Chaque type de produits réfrigérés est à maintenir à une température appropriée (par exemple, une température de 4°C maximum pour les viandes, les volailles...) Toute élévation sensible de la température du produit au-dessus de cette valeur provoque une accélération de la multiplication microbienne et des phénomènes de dégradation. La température de conservation des denrées doit rester aussi constante que possible en dessous de cette limite, depuis l'abattage ou la récolte jusqu'à la consommation. On parle ainsi de « chaîne du froid », l'efficacité de celle-ci dépendant de celle du maillon le plus faible.

Toutefois, selon les types d'aliments concernés, ces principes généraux peuvent être aménagés (essentiellement pour la précocité) ou être complétés par d'autres précautions (notamment à l'égard de l'humidité relative du produit). **Anonyme - Arrêté du (9 mai 1995)** réglementant

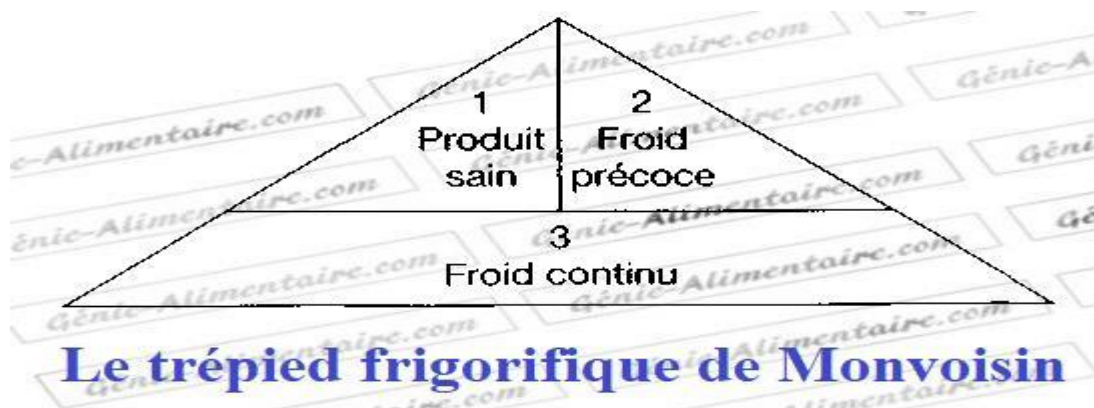


Figure 1 : Le trépied frigorifique de Monvoisin (chaîne du froid, conservation des aliments, produits réfrigérés et congelés) (Monvoisin, 2017).

Voici une illustration des différentes toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) provoquée par une rupture de la chaîne du froid.

Tableau 1: principaux microorganismes de toxi-infections alimentaires en cas de non-respect de la chaîne du froid. (Amat-Rose J.M, 1997)

Microorganismes	Température minimale de développement	Synthèses de toxines	Temps d'incubation	Symptôme
<i>Salmonella</i>	5°C		12-36h	Vomissement, diarrhée, fièvre, douleurs abdominales...
<i>Clostridium perfringens</i>	14°C	Entérotoxines : libérée dans l'intestin lors de la sporulation des formes végétales	8 – 12h	Diarrhée, déshydratation, douleurs abdominales, absence de fièvre.
<i>Bacillus cereus</i>	5°C	Toxine diarrhéique	8 – 12h	Diarrhée, déshydratation, douleurs

		libérée dans l'intestin		abdominales, absence de fièvre
		Toxine émétisante, préformée dans l'aliment	1 – 5h	Vomissement, nausée, occasionnellement diarrhée et douleurs abdominales...
<i>Staphylococcus aureus</i>	5°C – 12°C	Entérotoxines staphylococciques préformées dans l'aliment	1 – 8h	Vomissement, diarrhée, absence de fièvre, douleurs abdominales
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1°C	Toxine préformée dans l'aliment (et invasion des cellules intestinales)	1 – 5h	Diarrhée pouvant être accompagnée d'autres symptômes
<i>E. coli 0157 :H7</i>	5-12°C	Vérottoxines		Colles hémorragiques, syndrome hémolytique urémique
<i>Listeria monocytogenes</i>	1°C		3-70jours	Bactériémie associée ou non à une infection du système nerveux Central (méningite, méningo-encéphalite)

<i>Clostridium botulinium</i>	3°C	Neurotoxine botulique : préformée dans l'aliment (ou, plus rarement, produite dans l'intestin)	12-36h	Trouble oculaire, bucco-pharyngés. Dans le cas grave : mort du malade due à une paralysie respiratoire.
-------------------------------	-----	--	--------	---

I.5 Spécificités de la chaîne du froid selon les aliments :

I.5.1 Viande :

Juste après l'abattage la viande est sèche et dure, les caractères organoleptiques (succulence, tendreté, flaveur agréable, couleur rouge vif) désirés par le consommateur n'apparaissant qu'après une phase d'une huitaine de jours, dite de maturation. Les mécanismes qui y participent sont essentiellement biochimiques et enzymatiques. Le froid permet cette maturation tout en retardant les phénomènes de multiplication microbienne, responsables, entre autres, de la putréfaction des viandes. En effet, pour un même abaissement de température, les réactions de maturation sont moins freinées que les phénomènes d'altérations microbiennes. Ainsi, pour une température de 20°C, la putréfaction apparaît, en moins de 24 heures, avant la maturation. Par contre, à 0°C, la phase de maturation est de 10 jours, tandis que les premiers signes d'altération ne se manifestent qu'au bout de 12 à 16 jours

- La conservation de la viande au froid est donc une nécessité.

Mais, pour les carcasses bovines et ovines, le refroidissement doit être modéré. En effet un abaissement trop rapide provoquerait l'apparition d'une dureté irréversible au cours de leur maturation. Ce phénomène est appelé « cryochoc » ou « cold shortening. Il résulte de l'inhibition par le froid de l'enzyme responsable de la production de l'énergie nécessaire à l'activité musculaire. Il peut être évité en appliquant une vitesse de refroidissement peu élevée (température à cœur de 12°C atteinte en moins de 12 h.) ou en soumettant les carcasses à des stimulations électriques. **Rousset R (1995)**

Entre autres qualités, la tendreté de la viande proposée au consommateur est ainsi étroitement liée à une application raisonnée et stricte de la réfrigération.

I.5.2 Poisson :

Le poisson est un produit dont la qualité se dégrade très rapidement du fait, principalement, de réactions protéolytiques dues à des enzymes digestives, tissulaires et microbiennes. Sa conservation au froid permet de ralentir cette activité. La température doit être aussi proche que

possible de 0°C depuis la capture jusqu'à la remise au consommateur. Le processus d'altération débutant dès la mort de l'animal, l'application du froid doit donc être particulièrement précoce. Pour les poissons d'élevage ceci ne pose guère de problèmes du fait de la mise en œuvre immédiate des procédés de réfrigération. Par contre, pour les autres types de pêche, notamment en mer, des difficultés sont rencontrées. Des moyens efficaces de refroidissement et de conservation sont à mettre en œuvre sur les bateaux de pêche. L'utilisation de glace seule peut s'avérer insuffisamment performante. Le recours à des mélanges liquide/glace est plus efficace mais plus délicat à maîtriser.

Par ailleurs le transport et la présentation à la vente des poissons entiers est à faire, selon la réglementation, au moyen de glace fondante.

Enfin le froid constitue un auxiliaire technologique indispensable pour certaines procédures. Par exemple il peut intervenir pour favoriser la mise en œuvre de certains procédés de texturation de chair de poisson (surimi, surfine de mer,...) (Vallet, 1997)

I.5.3 Fruits et légumes :

Le froid a pour conséquence essentielle d'allonger la durée de vie des fruits et légumes en retardant leur altération. En effet il inhibe les réactions enzymatiques, notamment celles qui sont à l'origine de la biosynthèse de l'éthylène par les fruits et légumes. Ce gaz est responsable de leur sénescence et de leur mûrissement.

Cependant la température de conservation doit être appropriée car en dessous d'une certaine valeur les fruits et légumes développent des altérations particulières regroupées sous le vocable de « maladie physiologique du froid » (ou « chilling injury »). Le mécanisme exact de cette pathologie reste à ce jour inconnu. Le facteur déclenchant responsable est une conservation réalisée en dessous d'une certaine température et pendant un certain délai, spécifiques de l'espèce et de la variété de fruits ou légumes concernés (ex. : piment 5°C 3 j ; patate douce +7°C 2 semaines). Les symptômes (d'aspect proche de ceux causés par le gel) se manifestent tardivement, après arrêt de l'application du froid (Willemot, 2001). Par ailleurs la perte en eau des fruits et légumes est un élément à surveiller particulièrement. En effet au-delà de 4 à 6% de perte de leur poids initial, des altérations de la qualité se produisent, caractérisées essentiellement par un flétrissement irréversible. Le refroidissement, principale étape où cours de laquelle les pertes d'eau ont lieu, est à maîtriser. Les techniques d'emballage (sous-vide) et de réfrigération (humidification de l'air) permettent de pallier ce phénomène.

I.5.4 Lait et produits laitiers :

La durée de conservation du lait et des produits laitiers dépend essentiellement de la qualité microbiologique initiale du lait, avant son traitement thermique et/ou son éventuelle transformation. De ce fait une réglementation a été mise en place spécialement sur ce point. D'une part elle préconise des mesures d'hygiène (nettoyage-désinfection des matériels, vérification de l'absence de mammites,...) à adopter lors de la traite afin de limiter les contaminations. D'autre part elle rend obligatoire l'application précoce au froid pour lutter contre la multiplication des microorganismes. Aussi les éleveurs sont-ils amenés à assurer, à la ferme, le refroidissement du lait en ayant recours à des équipements spécifiques. La marque « NF Refroidisseurs de lait » leur garantit que ces matériels possèdent bien des performances satisfaisantes. Le lait peut être ainsi stocké à la ferme quelques heures à quelques jours avant d'être transporté par camion frigorifique vers les usines de transformation et/ou de conditionnement. (MAHIEU H. 2000)

I.6 Organisation technologique de la chaîne du froid :

I.6.1 Entreposage :

Après leur préparation, les denrées alimentaires sont expédiées vers des entrepôts frigorifiques où elles sont réassemblées et dirigées vers leur destination finale. La capacité en entreposage frigorifique industriel est très importante en France où elle est de 350 litres/habitant, alors qu'aux Etats-Unis elle est de l'ordre de 190 l/h. Ce volume se répartit approximativement entre 1/3 de locaux à température négative et 2/3 de chambres froides réfrigérées (Gac ,2000).

Dans ce secteur, l'évolution la plus significative de ces dernières années est l'émergence d'unités de volume important spécialisées dans ce domaine. Celles-ci disposent d'un arsenal d'outils pour limiter les variations de températures : ouvertures temporisées, doubles portes à lanières plastiques, quais réfrigérés, boudins gonflables assurant une meilleure étanchéité thermique au niveau de la liaison quai camion... De plus le recours généralisé à la gestion centralisée (ou télégestion) des systèmes d'alarme permet une meilleure maîtrise des températures, ce mode de surveillance permettant en effet de réagir rapidement en cas de dysfonctionnement de l'installation frigorifique. (Gac, 2000)

Le respect de différents niveaux de température, surtout pour les fruits et légumes, constitue la principale difficulté encore à résoudre. Pour y parvenir des entrepôts spécialisés se développent. Les autres progrès à réaliser résident essentiellement dans les gains d'espace et de volume. (Gac ,2000)

I.6.2 Transport :

Le transport des denrées alimentaires vers les points de distribution est réalisé en France principalement par voie routière, le parc de camions y étant important avec approximativement 73.000 engins, dont environ 90% de type « frigorifique » (**Billard, 1996**).

L'évolution la plus marquante dans ce domaine est la recherche de la polyvalence et de la flexibilité. Ainsi plus de la majorité des véhicules frigorifiques peuvent maintenant assurer un maintien en température compris entre -20°C et $+12^{\circ}\text{C}$, leur permettant de transporter à la demande soit des denrées réfrigérées soit des denrées surgelées ou des crèmes glacées. Les véhicules à plusieurs compartiments et à plusieurs températures représentent aujourd'hui 30% des ventes de véhicules frigorifiques. Ces véhicules permettent, en déplaçant la cloison mobile intérieure, un chargement adapté aux volumes à transporter. Enfin, pour le transport des fruits et légumes, certains camions ont été équipés de façon à assurer dans leur enceinte intérieure le maintien d'une humidité élevée.

Mais malgré ces progrès techniques il reste essentiel de respecter les bonnes pratiques professionnelles. Ainsi au cours du chargement la répartition des palettes dans le camion doit permettre une circulation de l'air froid suffisante et homogène. Il faut également veiller, pendant les arrêts de livraison, à limiter les temps d'ouvertures de portes (**Billard, 1996**).

I.6.3 Distribution :

Ces dernières décennies la distribution s'est principalement développée au bénéfice des grandes surfaces de vente (augmentation de 51% du nombre d'hypermarchés et de supermarchés de 1982 à 1992) **Billard F (1996)**

. Si l'on met bout à bout les meubles frigorifiques de vente, la longueur totale serait pour la France de 3.200 km, dont 2.000 km pour les seuls appareils réfrigérés (**GAC ,2000**).

L'exposition des denrées alimentaires à la vente constitue un maillon fragile dans la chaîne du froid. Les meubles fermés (nécessité d'ouvrir une porte ou un couvercle pour se servir) sont à ce jour moins utilisés et restent plutôt réservés à la vente des produits à température négative. Les meubles ouverts (accès direct aux produits) sont pratiquement les seuls appareils utilisés pour les denrées réfrigérées. Toutefois ces derniers présentent des difficultés techniques considérables pour maintenir les aliments aux températures souhaitées, et actuellement seuls les matériels les plus performants y arrivent. En effet, exposées vers l'extérieur, les denrées ont tendance à être réchauffées par l'air et le rayonnement thermique du magasin. Quelles que soient les performances des meubles, de bonnes pratiques d'utilisation sont à respecter : nécessité d'introduire dans le meuble des denrées à température aussi basse que possible (les

appareils n'étant pas conçus pour abaisser leur température), respect des limites maximales de chargement afin de ne pas perturber les flux d'air froid. (GAC ,2000).

En pratique, si les températures des aliments sont satisfaisantes dans certains appareils, il n'est pas rare de rencontrer encore des meubles frigorifique de vente présentant, au niveau des denrées, des températures comprises entre +6 et +8°C.

I.6.4 Consommation domestique :

Ce maillon est celui qui, à la fois, est le plus faible de la chaîne du froid, et qui concerne le maximum de personnes, 99% des foyers disposant d'au moins un appareil frigorifique ménager (GAC, 2000)

Selon une enquête récente (Enquête INCA), cette fragilité dépend de plusieurs éléments :

- ❖ Retard à la mise en réfrigération des produits. Le délai, trop souvent important, entre leur achat et leur rangement dans le réfrigérateur ménager constitue une véritable rupture de la chaîne du froid.

- ❖ Méconnaissance de la température intérieure du réfrigérateur et réglage défectueux du thermostat de régulation. Non seulement la plupart des consommateurs (60%) ignorent la température idéale souhaitée pour la conservation des denrées dans leur réfrigérateur, mais en pratique l'appareil ne leur permet que rarement d'avoir connaissance de la température réelle. Les indications fournies par le thermostat sont souvent arbitraires et sans rapport avec les températures délivrées, d'où des réglages trop souvent défectueux. Ainsi, toujours selon l'enquête INCA, seuls 11% des appareils présentent une température moyenne conforme, inférieure ou égale à +4°C. Pour 52% des ménages la valeur relevée dépasse +6°C, et dans 18% des cas elle est supérieure ou égale à +10°C (Credoc ,2000)

- ❖ Non-respect des dates limites de consommation. Les indications apportées par l'étiquetage (DLC, DLUO) sont à respecter, les premiers produits entreposés dans l'appareil sont à consommer en priorité (first in/first out).

Par ailleurs, l'Académie Nationale de Médecine a repris ces éléments dans des recommandations relatives à la conception et à l'utilisation des réfrigérateurs ménagers afin d'inciter fabricants d'appareils et consommateurs à d'avantage de vigilance (Rosset, 2001).

I.7 Intérêt de la conservation des aliments par réfrigération :

Les méthodes de conservation ont pour objectif de produire des aliments disponibles dans l'espace et dans le temps. En d'autres termes, par des techniques de conservation il est possible de trouver, à tout moment et à n'importe quel endroit, des aliments à majorité des cas saisonniers et/ou à courte durée de vie. Les phénomènes d'altération des produits alimentaires

dépendent de la température. En effet, le froid permet de ralentir ou d'inhiber les phénomènes d'altération des aliments en agissant sur les micro-organismes et l'évolution des réactions biochimiques d'altération. (Commère et Billard, 1999).

I.7.1 Le domaine du froid s'étend de +12°C à -45°C environ

Tableau 2 : réactions de quelques micro-organismes à des températures clés (THIERRY Laugier, 2007).

+10°C	Arrêt de production de toxines par staphylocoque doré et bacille botulique
+6°C	Arrêt de la multiplication de staphylocoque doré
+5°C	Arrêt de multiplication de salmonelle
+3°C	Arrêt de toxicité de bactéries pathogènes
0°C	Réfrigération
-10°C	Arrêt de toute multiplication bactérienne
-18°C	Arrêt de la multiplication des moisissures

I.8 CONCLUSION :

Le marché des produits réfrigérés s'est développé de manière spectaculaire ces dernières décennies. La conservation au froid s'est largement répandue pour les produits bruts, mais a aussi permis l'essor d'une nouvelle génération d'aliments : les denrées prêtes à l'emploi. Cette évolution est liée à d'importantes mutations technologiques. D'une part des investissements considérables ont été réalisés, aux différentes étapes de la production et de la distribution, pour assurer une chaîne du froid performante. D'autre part de nouveaux procédés de fabrication et de conditionnement permettent aujourd'hui d'obtenir des produits prêts à l'emploi se conservant au froid pendant plusieurs semaines : des DLC de 4 semaines peuvent être facilement obtenues.

CHAPITRE II :
Importance des espèces de *Pseudomonas*
psychrotrophes en hygiène des denrées
alimentaires.

CHAPITRE II :
Importance des espèces de *Pseudomonas* psychrotrophes en hygiène des denrées
alimentaires.

II.1 Introduction :

La conservation des denrées alimentaires par l'emploi de la technique de la réfrigération connaît un important essor, notamment dans le domaine des plats cuisinés, au détriment des procédés de congélation et surtout d'appertisation. L'intérêt de la réfrigération est de ne pas induire de modification organoleptique des produits alimentaires, alors que les autres procédés physiques ne conservent pas toujours aux denrées un aspect de produits frais. L'amélioration constante des performances techniques des moyens frigorifiques de transport et d'entreposage, ainsi que la mise au point de techniques nouvelles d'élaboration et de conditionnement des produits ont favorisé la commercialisation de produits réfrigérés dont la durée de conservation peut atteindre plusieurs semaines voire plusieurs mois. Cette évolution technologique fait actuellement l'objet d'une large remise en cause. La recherche d'une conservation très prolongée des produits contribue à réaliser la sélection de flores microbiennes spécifiques, qualifiées de psychrotrophes, dont la plus médiatisée, *Listeria monocytogenes*, est au centre des préoccupations des responsables de la santé publique. (Anonyme, 1978)

II.2 Définition, caractéristiques et classification des bactéries

psychrotrophes :

Les bactéries psychrotrophes sont définies sur la base de leurs caractéristiques spécifiques en matière de thermosensibilité.

II.2.1 DÉFINITION DES BACTÉRIES PSYCHROTROPHES :

L'activité bactérienne obéit aux lois de la thermodynamique, en particulier pour ce qui concerne la cinétique des réactions enzymatiques. Chaque souche bactérienne est structurellement adaptée à une gamme de températures donnée : ces températures sont qualifiées d'eugénésiques (Roberts, 1999)

La vitesse de croissance est maximale pour une valeur de la température qualifiée de température optimale de croissance. De part et d'autre de cet optimum, l'activité métabolique ralentit, jusqu'à être totalement inhibée au-delà des températures minimale et maximale de croissance. Il est possible de classer les bactéries en différents groupes, selon la valeur de la température optimale de croissance.

On distingue ainsi les bactéries thermophiles, mésophiles et psychrophiles. Cette classification fait cependant l'objet de controverses et les valeurs présentées au tableau I diffèrent selon les auteurs. (CATTEAUM, 1999) et (FOURNAUD.J., 1982)

Valeurs entre lesquelles se situe la température optimale de croissance du microorganisme considéré.

Tableau 3 : Classification des micro-organismes selon leur température optimale de croissance

Thermophiles	Mésophiles	Psychrophiles
+40°C et +55°C		
	+20°C et +40°C	
		+5°C et +20°C

Indépendamment de ces considérations relatives à la température optimale de croissance, il est d'usage de qualifier de psychrotrophes les micro-organismes qui conservent une activité notable à des températures inférieures ou égales à +7°C. Selon cette définition, les bactéries psychrophiles appartiennent aussi au groupe des psychrotrophes, mais en pratique les principales bactéries psychrotrophes d'intérêt alimentaire sont mésophiles (**Catteaum, 1999**)

Noté bien :

Il faut noter que le monde des micro-organismes psychrotrophes ne se limite pas aux seules bactéries. On rencontre aussi un nombre très important d'espèces de micromycètes, agents de l'altération au froid des denrées alimentaires.

II.3 Les bases métaboliques :

A des températures proches de 0°C, les micro-organismes subissent des désordres métaboliques et des lésions cellulaires pouvant être importants. Cet état physiologique de "stress froid" (**Druesne, 1996**) est principalement la conséquence d'une fragilisation des liaisons hydrophobes, induite par la réfrigération. Il en résulte une perte de fonctionnalité des protéines enzymatiques, par modification de leur conformation dans l'espace. La structure quaternaire est profondément modifiée, avec une dissociation des complexes polymériques. L'assemblage des ribosomes est inhibé, ce qui provoque une diminution des synthèses protéiques. La fluidité des membranes est réduite et l'ensemble des fonctions membranaires telles que le transport des ions ou des nutriments s'en trouve affecté (**Gounot, 1995**)

Les bactéries psychrotrophes possèdent une relative capacité de résistance au «stress froid», mettant en jeu des mécanismes dont les principaux sont la synthèse d'enzymes adaptées à

fonctionner à basse température, l'adaptation de la composition des membranes en acides gras insaturés et la synthèse de protéines «de choc thermique» (**Druesne, 1996 ; Gounot , 1995**)

Chez *Escherichia coli*, les deux représentants principaux de la famille des protéines «de choc thermique» sont GroEL et DnaK, très proches des protéines HSP 60 et HSP 70 des cellules eucaryotes (**Gounot, 1995**)

Leur synthèse est fortement stimulée lors de stress thermique : la teneur en protéines de choc thermique peut représenter 10 % du total des protéines dans une cellule stressée. Le principal rôle connu de ces molécules est celui de «chaperon» : elles se fixent sur les protéines dénaturées, protégeant les sites hydrophobes, et les aident à retrouver une structure tertiaire normale. Certaines ont aussi une activité protéasique.

II.4 Les principales bactéries psychrotrophes :

Il est possible de classer les bactéries psychrotrophes en deux groupes, en fonction de leurs effets : les agents de toxiinfections alimentaires et les agents d'altérations des aliments.

II.4.1 Les agents de toxi-infections alimentaires :

En se basant sur les statistiques actuellement disponibles concernant la fréquence de la contamination des produits alimentaires et compte-tenu de l'actualité récente (**Pierre et Veit, 1996**).

Il faut retenir la place prépondérante de *Listeria monocytogenes* en tant que bactérie psychrotrophe pathogène pour l'homme. Les espèces *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* de type E sont impliquées de façon beaucoup plus rare, en Europe, dans des accidents d'origine alimentaire. D'autres bactéries présentent un intérêt pratique mineur, en particulier *Aeromonas hydrophila* et *Plesiomonas shigelloides*.

Enfin, il faut noter que certaines souches de *Salmonella* et de *Escherichia coli* sont susceptibles de se développer entre +5°C et +7°C, mais que ces souches restent atypiques de sorte que ces micro-organismes ne sont pas considérés parmi les psychrotrophes. (**CATTEAUM, 1999**).

II.4.2 Agents d'altérations des aliments :

Les bactéries psychrotrophes agents d'altérations des aliments sont beaucoup plus nombreuses et variées, mais la famille des Pseudomonadaceae est souvent la plus représentée.

Elle regroupe des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, mobiles par ciliature polaire et aérobies stricts (**Anonyme, 1986**)

Le genre *Pseudomonas* possède la meilleure capacité de développement au froid et présente une activité significative jusqu'à une température de +2°C. (**Gill et Newton, 1977**) Les genres *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Alteromonas* et *Flavobacterium* sont aussi fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires.

Les entérobactéries psychrotrophes appartiennent principalement aux genres *Enterobacter*, *Serratia* et *Hafnia*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs. On peut citer les espèces *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquifaciens* et *Hafnia alvei*. Certaines souches présentent une température minimale de croissance inférieure à 0°C (**Catteaum, 1999**).

Les bactéries lactiques sont largement représentées au sein du groupe des psychrotrophes. Ce sont des bacilles ou des Cocci à Gram positif, non sporulés, dépourvus de catalase, produisant de l'acide lactique selon un métabolisme homo ou hétéro-fermentaire. Les lactobacilles présentent une activité jusqu'à une température de +2°C. On rencontre aussi des bactéries des genres *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Pediococcus*. (**Garry et Le Guern, 1999**).

Parmi les autres bactéries psychrotrophes d'intérêt dans le domaine alimentaire, il faut citer les genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*, certains *Bacillus* et *Clostridium* ainsi que les bactéries corynéformes, en particulier l'espèce *Brochothrix thermosphacta*.

II.5 Caractéristiques physiologiques des bactéries psychrotrophes :

II.5.1 Courbe de croissance :

Les bactéries mésophiles psychrotrophes présentent, aux températures de réfrigération, une courbe de croissance caractérisée par une phase de latence longue, pouvant durer plusieurs jours, et par une pente très faible au cours de la phase de croissance exponentielle, témoignant d'un allongement important du temps de génération.

Plus la température est proche de la température limite inférieure de croissance et plus la multiplication est lente.

Des écarts très faibles de température peuvent avoir une incidence notable sur l'activité de la flore psychrotrophe. Ainsi, si une température de +2°C exerce un effet inhibiteur très net, une activité bactérienne très significative peut être constatée dès +4°C.

Il faut aussi noter que les différentes capacités métaboliques ne subissent pas toutes une inhibition identique. Ainsi, à +4°C, les *Pseudomonas* ont une croissance lente mais présentent une importante activité de synthèse d'enzymes qui réalisent l'hydrolyse du substrat alimentaire. (Bourgeois et Zucca, 1996).

II.5.2 Sensibilité à la chaleur :

Les bactéries psychrotrophes présentent une sensibilité particulière au stress «chaud», caractérisée en particulier par une température maximale de croissance inférieure à +45°C et une température létale inférieure à +50°C. On peut ainsi citer les températures limites de croissance suivantes : +35°C pour *Acinetobacter*, +40°C pour *Alcaligenes*, +43°C pour *Pseudomonas* et +45°C pour *Listeria monocytogenes* (Larpen, 1995).

II.5.3 Autres caractéristiques importantes :

En ce qui concerne l'influence du pH, il faut noter que la plupart des bactéries psychrotrophes sont neutrophiles. Seules font exception à cette règle les bactéries lactiques et *Listeria monocytogenes* qui tolèrent des pH acides jusqu'à une valeur limite de 5 (Larpen, 1995).

Le genre *Pseudomonas* est très exigeant en eau libre et ne se développe bien que pour des valeurs d'activité de l'eau (A_w) supérieures à 0,98 (Bourgeois et Zucca, 1996).

Au contraire, *Listeria monocytogenes* résiste à des conditions hostiles. Elle tolère jusqu'à 10 % de chlorure de sodium (Larpen, 1995) et son A_w limite de croissance est de 0,86. Il faut enfin retenir la forte production de bactériocines par les lactobacilles, qui intervient dans les phénomènes de compétitions bactériennes.

II.6 Importance pratique des bactéries psychrotrophes :

II.6.1 Les bactéries psychrotrophes agents de toxi-infections alimentaires :

Parmi les maladies d'origine alimentaire dues à des bactéries psychrotrophes, la listériose constitue actuellement la principale menace pour la santé publique.

II.6.1.1 La listériose :

Si *Listeria seeligeri* et *Listeria ivanovi* ont été incriminées de façon exceptionnelle dans des cas d'infection humaine, c'est l'espèce *Listeria monocytogenes* qui présente un pouvoir pathogène significatif chez l'homme et l'animal. La listériose est une infection atypique, que l'homme contracte principalement par voie alimentaire. C'est une maladie rare, dont on décrit

environ 300 cas chaque année en France. (**Rocourt et al., 2000**), mais grave puisque la létalité peut atteindre jusqu'à 30 %. Elle évolue généralement sous forme de cas sporadiques mais plusieurs épidémies ont été décrites. (**Larpen et al., 1994**).

Les formes cliniques de listériose sont observées dans 80 % des cas chez des individus présentant une déficience de l'immunité à médiation cellulaire : nouveau-né, vieillard, femme enceinte ou personnes atteintes de maladies immunosuppressives. Bactérie pathogène opportuniste, *Listeria monocytogenes* est l'agent, chez ces personnes «à risque», de septicémies, méningites, encéphalites et endocardites. Des séquelles neurologiques sont possibles.

Chez la femme enceinte, l'avortement est fréquent. *Listeria monocytogenes* est présente dans l'environnement. On considère que son biotope naturel est le sol, où elle se développe en saprophyte sur des végétaux en décomposition. Elle est principalement rencontrée dans les aliments végétaux crus et les produits à base de lait cru, mais tous les types de denrées peuvent être contaminés comme en témoignent les épidémies récentes dues à des produits de charcuterie. (**Rocourt et Jacquet, 1994**).

II.6.1.2 Les toxi-infections alimentaires dues à *Yersinia enterocolitica* :

Les toxi-infections alimentaires dues à *Yersinia enterocolitica* sont rares en France, mais sont décrites de façon beaucoup plus fréquente dans certains pays d'Europe du Nord. *Yersinia enterocolitica* est une bactérie à pouvoir entéroinvasif, agent de gastro-entérites fébriles. Les principales souches pathogènes appartiennent aux biotypes 2, séro groupe 0 :9, et 4, séro groupe 0 :3.

Si la présence de *Yersinia enterocolitica* est fréquemment détectée sur de nombreux produits alimentaires, en particulier les végétaux, les souches présentant des attributs de pathogénicité sont essentiellement rencontrées chez le porc, au niveau du tube digestif et de certains tissus tels que les amygdales. Les principaux aliments incriminés lors de toxiinfection sont, de ce fait, les viandes de porc lorsqu'elles sont consommées crues ou peu cuites. Les produits laitiers ont aussi été mis en cause dans certains cas. (**Zucca, 1996**).

II.6.1.3 Les toxi-infections alimentaires dues à *Bacillus cereus* :

Bacillus cereus est un bacille à Gram positif, sporulé, aéro-anaérobies facultatif, bactérie tellurique contaminant fréquemment les végétaux. Il possède deux types de toxines

impliquées dans des accidents d'origine alimentaire : des toxines diarrhéogènes et une toxine émétisante.

Les toxines diarrhéogènes, thermolabiles, sont libérées dans l'intestin grêle lors de la sporulation de la bactérie.

Elles provoquent une diarrhée aqueuse, parfois associée à des vomissements. La toxine émétisante, préformée dans les aliments et thermorésistante, provoque des vomissements, incoercibles et répétés, accompagnés de nausées, de céphalées, de douleurs abdominales, d'hypotension et parfois de diarrhée. La guérison survient généralement sous 24 heures. **(Bourgeois et Zucca, 1996).**

Seules certaines souches de *Bacillus cereus* sont psychrotrophes et seraient capables de proliférer à +4°C et de produire des toxines à +6°C.

Le réservoir de cette bactérie est hydro-tellurique en raison de sa survie possible dans l'environnement sous forme de spore. Les principaux aliments à risque sont d'origine végétale, en particulier le riz et les épices. *Bacillus cereus* est un contaminant potentiel de nombreux plats cuisinés.

La cuisson ne suffit généralement pas à détruire les spores de cette bactérie, dont la germination et la croissance peuvent s'effectuer si le produit est entreposé au froid positif de façon prolongée.

II.6.1.4 Le botulisme à *Clostridium botulinum* de type E :

Clostridium botulinum de type E est une bactérie sporulée, anaérobie stricte, qui produit une neurotoxine dans les aliments jusqu'à des températures de +3,3°C. Les signes cliniques de botulisme apparaissent après une incubation de 2 à 24 heures, voire jusqu'à huit (8) jours.

Leur intensité varie selon la dose ingérée. Ils consistent en des paralysies oculaires, avec troubles de l'accommodation, mydriase et diplopie, une sécheresse de la bouche, des troubles de la déglutition et de l'élocution et, dans les formes graves, une paralysie des muscles respiratoires pouvant entraîner la mort.

Clostridium botulinum de type E est essentiellement rencontré sous forme sporulée dans les sédiments marins et dans le tube digestif des poissons. Les principales denrées à risque sont donc les produits de la pêche et leurs dérivés, conditionnés sous vide. **(Bourgeois et Zucca, 1996).**

II.7 Principaux facteurs de risque :

Il apparaît clairement que de très nombreuses familles de produits peuvent héberger des bactéries psychrotrophes pathogènes.

Une conservation prolongée au froid positif assure l'inhibition des autres populations microbiennes et constitue une cause de danger en créant une "niche écologique" libre pour les flores psychrotrophes. Seules des températures très proches de 0°C permettent d'inhiber les agents pathogènes de façon satisfaisante.

La cuisson ou la pasteurisation des aliments n'assurent pas un assainissement vis-à-vis des bactéries sporulées. Par contre, *Yersinia enterocolitica* est très thermosensible. En ce qui concerne *Listeria monocytogenes*, le temps de réduction décimale mesuré dans divers aliments varie de 1 à 36 secondes à 72°C, (Larpent, 1995), de sorte que si la pasteurisation est efficace, certains barèmes de cuisson des viandes, à température finale de +55°C à +58°C, peuvent ne garantir qu'un assainissement très limité. Le problème des recontaminations après traitement doit aussi être pris en compte. Il a été largement évoqué lors des récentes épidémies de listériose mettant en cause des rillettes et des langues de porc en gelée. (Rocourt et al., 2000)

II.8 Influences des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées :

De nombreux types d'altérations des denrées dues à l'action de bactéries psychrotrophes ont été décrits. Ils sont le résultat de l'activité d'enzymes microbiennes exocellulaires et affectent, selon les cas, la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur du produit.

II.8.1 Protéolyse et lipolyse :

La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres puis de produits de leur décarboxylation ou de leur désamination.

Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et exceptionnellement d'une toxicité de l'aliment.

Ce type de métabolisme est rencontré en particulier chez les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium*, mais aussi chez les *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus* et les entérobactéries. A l'exception des lactobacilles, ces différentes bactéries se caractérisent aussi par une activité lipolytique importante.

La lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres. Elle modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses, avec apparition du goût de rance, et favorise le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés en méthyl cétones.

Si de nombreuses bactéries psychrotrophes sont très facilement détruites lors d'un traitement par la chaleur, les lipases et surtout les protéases sont pour la plupart beaucoup plus thermorésistantes. Certaines résistent quelques dizaines de secondes à des températures de +140 à +150°C et ne seront donc pas détruites, par exemple, lors de la stérilisation du lait. (MAHIEU, 2000).

II.8.2 Autres types d'altérations :

Parmi les autres types d'altérations, on peut aussi citer :

- les modifications de la consistance du produit, notamment par production d'exopolysaccharides à l'origine par exemple d'une consistance filante des laits décrite avec les genres *Micrococcus* et *Alcaligenes* ;
- les phénomènes d'acidification, par fermentation des sucres, activité caractéristique du groupe des bactéries lactiques, soit les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Lors de processus hétéro fermentaire, la formation de gaz, d'aldéhydes et de cétones est à l'origine de modifications du goût et de l'odeur du produit.
- l'apparition de colorations, d'odeurs et de saveurs anormales, dont quelques exemples figurent dans le tableau2.. **Rosier F. (1995)**

Tableau 4 : Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes. **Rosier F. (1995)**

Produit concerné	Modification constatée	Agent
Lait	Coloration bleue	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Beurre	Couleur verte	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Toutes denrées	Amertume	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>enterococcus faecalis</i>
Toutes denrées	Gout fruité (de fraise)	<i>Pseudomonas fragi</i>

Au plan macroscopique, le type d'altération observé varie, d'un produit à un autre, en fonction de la nature et de l'importance de la contamination microbiologique initiale et des conditions

écologiques offertes à cette flore, du fait de la composition de la denrée : activité de l'eau, nature des principaux constituants, pH, potentiel d'oxydoréduction...

De ce fait, certains produits alimentaires réfrigérés ne constituent pas, par nature, un substrat favorable à la croissance des bactéries psychrotrophes, en particulier les laits fermentés. Pour ces produits, les agents d'altérations seront alors non pas des bactéries mais des micromycètes beaucoup plus tolérants à des conditions extrêmes d'environnement telles que l'acidité des yaourts. **Rosier F. (1995)**

II.8.3 Applications à la maîtrise de la qualité et de la salubrité des denrées réfrigérées :

Plusieurs types d'actions sont nécessaires à la maîtrise de la qualité et de la salubrité des denrées réfrigérées. Deux objectifs complémentaires sont à atteindre : minimiser le niveau de contamination initial et réaliser une inhibition aussi parfaite que possible de l'activité bactérienne.

II.9 Maîtrise des sources de contamination :

Pour tous les produits, la contamination peut être prévenue par l'application des règles de bonnes pratiques hygiéniques. Il faut en particulier remarquer l'importance capitale des procédures de nettoyage et de désinfection (**Salvat et Ermel, 1997**), dans la prévention des contaminations par *Pseudomonas* et par *Listeria*. Ces bactéries ont en effet la capacité de coloniser les locaux froids et humides, tels que les ateliers de découpe de viandes et les chambres froides, notamment au niveau des incrustations de tartre.

Quoiqu'absolument nécessaires, ces mesures ne permettent que de limiter la charge microbienne du produit sans garantir une réelle maîtrise des flores psychrotrophes.

Tableau 5: Principaux procédés permettant un assainissement des denrées alimentaires vis-à-vis des flores psychrotrophes. (**Rosser R, 1974**)

Produit	Procédé
Salade prête à l'emploi (de quatrième gamme)	Lavage et désinfection (Protocole usuel : trempage pendant 5 à 10 minutes dans une solution javellisée, à raison de 20 ml d'eau de Javel à 12° Cohl dans 50 litres d'eau).

Viandes de volailles en carcasses	Douchage à l'aide d'une solution d'ortho phosphate trisomique
Fruit frais	Traitement par les rayonnements ionisants (Radurisation)
Toutes denrées	Traitements par la chaleur : thermisation, cuisson, pasteurisation, stérilisation

II.9.1 ASSAINISSEMENT :

La destruction précoce des bactéries psychrotrophes participe à la conservation ultérieure du produit. Elle peut être réalisée selon différentes méthodes, rappelées dans le tableau 5. Dans le cas de la cuisson ou de la pasteurisation, qui constituent les procédés les plus largement mis en œuvre, il faut retenir que les protocoles utilisés ne permettent pas d'éliminer une partie de la flore végétative, en particulier la flore lactique du produit, ni les spores bactériennes. Seule la stérilisation assure une destruction ou une inhibition de la totalité de ces micro-organismes. Pour beaucoup de produits cuits, le conditionnement final s'effectue après l'étape de cuisson. Dans ce contexte technologique, l'effet favorable du traitement thermique en matière de conservation de la denrée ne peut être préservé qu'au prix de la mise en œuvre de mesures spécifiques de prévention des "recontaminations" du produit lors des manipulations survenant après cuisson. C'est la raison pour laquelle des "salles blanches", spécialement conçues et équipées, existent dans de nombreux outils industriels agro-alimentaires, notamment au niveau des ateliers de tranchage et de conditionnement du jambon cuit. Il faut aussi remarquer que, compte-tenu de la bonne thermorésistance des enzymes, il est utile d'appliquer le traitement assainissant le plus précocement possible, pour éviter la synthèse de quantités importantes de lipases et de protéases. On réalise par exemple la thermisation du lait à la ferme, immédiatement après la traite. **Anonyme, (1978)**

II.9.2 RÈGLES DE RÉFRIGÉRATION :

Malgré les limites évidentes de l'efficacité de la réfrigération pour assurer l'inhibition des bactéries psychrotrophes, il apparaît utile de veiller à respecter les règles dites du «trépied de Monvoisin», soit l'application précoce d'un froid intense et continu. Plus la température de réfrigération n'est proche de +0°C et plus le temps de génération des bactéries psychrotrophes seront long. Cependant, à +0°C l'activité de certaines enzymes persiste et limite la conservation du produit. Pour assurer une inhibition totale de ces enzymes, il faudrait recourir à la congélation. D'un point de vue pratique, il apparaît donc déterminant de disposer de

moyens frigorifiques très performants à tous les stades de la chaîne de production et de distribution des produits réfrigérés, en particulier dans les organismes de restauration collective qui pratiquent la liaison froide.

Des moyens de surveillance du respect de la chaîne du froid sont aussi indispensables, notamment des enregistreurs de température ou des intégrateurs temps-température. Si la mise en place de tels moyens peut être envisagée dans un contexte de type industriel, les épidémies récentes de listériose ont été l'occasion de rappeler que les réfrigérateurs ménagers constituent très généralement un maillon faible de la chaîne du froid. Les températures constatées dans ce type d'enceintes frigorifiques sont rarement inférieures à +6°C voire +8°C, ce qui crée des conditions favorables à une croissance rapide des bactéries psychrotrophes. L'amélioration des performances techniques de ces matériels apparaît indispensable, de même que l'installation systématique de thermomètres permettant aux consommateurs de s'assurer du bon fonctionnement de leurs réfrigérateurs. (**Garry et Guern, 1999**)

II.9.3 EMPLOI DE CONDITIONNEMENTS PARTICULIERS :

Le mode de conditionnement des denrées peut aussi modifier les conditions écologiques offertes aux bactéries et favoriser certaines populations bactériennes. Associé à la réfrigération, le conditionnement sous vide des denrées alimentaires a pour but d'assurer l'inhibition des bactéries psychrotrophes aérobies strictes. Il s'établit alors une compétition entre des flores aéro-anaérobies facultatives, principalement entre des *Enterobacteriaceae* et des *Lactobacilles*. La réfrigération des produits à +2°C a un effet inhibiteur plus intense vis-à-vis des entérobactéries. Les lactobacilles connaissent alors un développement préférentiel et complètent l'effet inhibiteur du froid sur les entérobactéries en réalisant une acidification lactique du produit ainsi que la production de bactériocines. Les altérations de ce type de denrée apparaissent tardivement et sont la conséquence de l'activité protéolytique des lactobacilles ou de flores sous-dominantes telles que *Brochothrix thermosphacta*. Le conditionnement sous atmosphère modifiée exploite l'effet bactériostatique du dioxyde de carbone, utilisé à des concentrations variant de 25 à 80 %. L'effet bactériostatique est particulièrement net vis-à-vis des genres *Pseudomonas* et *Achromobacter* ; il est moindre dans le cas des entérobactéries et presque nul vis-à-vis des lactobacilles. Dans ce cas, le même type de compétition s'installe que pour les produits conditionnés sous vide. (**Druesne A. 1996**).

II.9.4 Choix raisonné de la durée de vie commerciale des produits :

Finalement, la question essentielle posée est celle de la durée de conservation des produits réfrigérés.

Très directement dépendante des procédés utilisés et des conditions de leur maîtrise, la date limite de consommation des denrées doit être fixée sur la base de tests de vieillissement prenant en compte les effets de la flore psychrotrophe.

Entièrement responsables de leurs choix dans ce domaine, les industriels de l'agro-alimentaire sont confrontés à des demandes souvent irréalistes de leurs clients et à un manque évident de directives de la part des services officiels de contrôle.

L'élaboration d'un protocole raisonné de validation de la date limite de consommation implique une réflexion globale quant aux critères microbiologiques à utiliser, aux plans d'échantillonnage à appliquer et aux conditions auxquelles le produit sera exposé durant la phase de "vieillissement". Trop souvent fondés sur les critères microbiologiques réglementaires, les tests réalisés ne permettent pas une réelle appréciation de l'évolution de la flore d'altération spécifique de chaque produit.

Il est, par exemple, préférable de procéder à la recherche de *Pseudomonas marginalis* ou de la flore lactique dans des produits végétaux de quatrième gamme, plutôt que de chercher à en apprécier la qualité sanitaire au travers du dénombrement de la flore aérobie à +30°C.

(BORNET, 1996).

Une approche spécifique est nécessaire en ce qui concerne les bactéries pathogènes psychrotrophes. Des tests d'ensemencement volontaire ou "challenge-tests" paraissent indispensables, afin de fixer produit par produit des conditions de conservation adaptées pour garantir l'inhibition de la croissance de ces bactéries. **(BORNET, 1996).**

PARTIE EXPERIMENTALE

III.1 MATERIELS ET METHODES :

Protocole réalisé par (**Labelle *et al.* , 1972**)

III.1.1 Objectifs :

Le travail s'est déroulé sur trois étapes à savoir :

- ✓ la recherche sur la flore microbienne psychrotrophe des carcasses de volailles (expérience sur le poulet) ;
- ✓ Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle (fromage et lait) ;
- ✓ Thermorésistance des bactéries psychrotrophes du lait cru et de leurs protéinases

D'où les principaux buts de ce travail sont :

- ✓ Isolement des microorganismes psychrotrophes ;
- ✓ Etude physiologique des microorganismes psychrotrophes ;
- ✓ Sélection des *Pseudomonas*.

Protocoles générales à suivre :

Une série de dilutions (jusqu'à la dilution 10^{-4}) a été effectuée à partir de la solution mère que l'on homogénéise par agitation dans un vortex. A partir d'une pipette graduée stérile 1ml de la solution mère a été prélevé et introduit dans le 1^{er} tube contenant 9 ml de tryptone sel stérile. L'agitation a été réalisé jusqu'à la dernière dilution .et une nouvelle pipette a été renouvelée pour chaque nouvelle dilution.

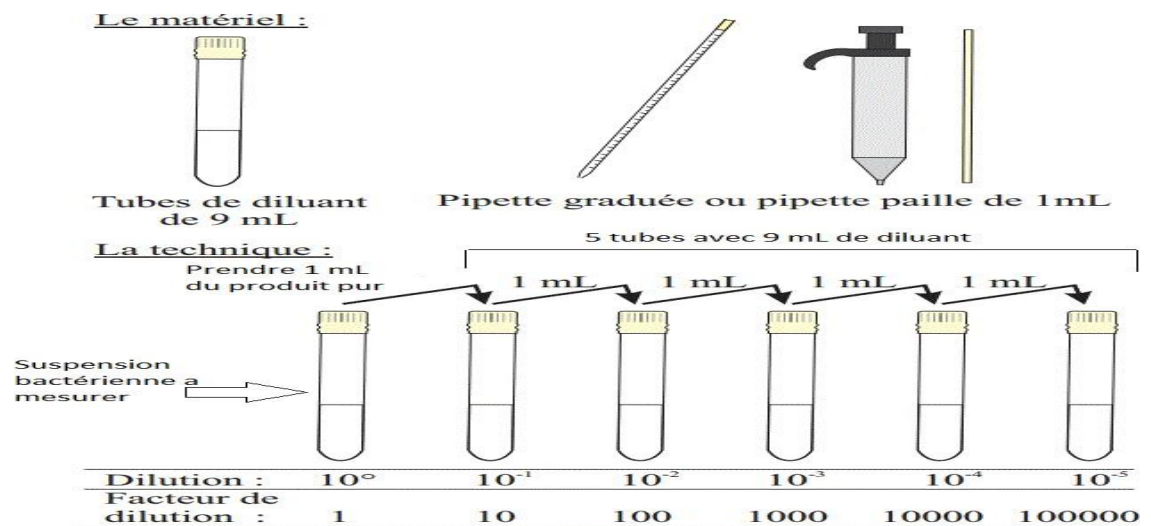


Figure 2 : Les étapes de la préparation des dilutions décimales

III.1.2 La flore psychrotrophe des carcasses de volailles

III.1.2.1 Evolution aux différents postes d'une chaîne d'abattage.

L'étude a porté sur 90 poulets provenant d'un élevage industriel breton, abattus dans un seul abattoir à l'âge de 8 semaines et reconnus propres à la consommation humaine par le Service d'inspection vétérinaire.

Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage de la peau avec des cotons tiges imbibés d'eau distillée stérile ; trois parties de la carcasse, connues pour être habituellement les plus contaminées, ont été explorées :

- la poitrine, (à la racine de l'aile),
- le bréchet,
- la cuisse (en face interne).

La surface de chaque prélèvement était délimitée grâce à l'utilisation d'un cadre métallique évidé stérile de 2cm².

Pour une carcasse donnée, la représentativité de ces prélèvements, nécessairement limités en nombre comme il est indiqué ci-dessus, alors que la peau des volailles n'est pas contaminée de façon uniforme, n'est pas la seule question qui se pose quant à l'interprétation statistique des résultats.

En effet il est aussi très difficile de déterminer la taille de l'échantillon réellement représentatif d'un lot de volailles car la variabilité entre les sujets d'un même lot est très grande.

De plus il n'est pas possible d'examiner les mêmes sujets aux différents postes de la chaîne si l'on veut suivre l'évolution des contaminations dans les conditions de la pratique car le temps écoulé entre le début et la fin des opérations serait considérablement augmenté d'ailleurs un prélèvement ayant été fait en un endroit donné, il ne peut être question d'en faire un autre à ce même endroit à l'un quelconque des postes suivants.

Afin de concilier les différents impératifs évoqués, pour chaque poste étudié, une même carcasse a été examinée à deux reprises :

- Avant le poste, par écouvillonnage, sur l'un des côtés, des trois parties précédemment déterminées, le poulet étant bagué pour qu'il puisse être reconnu,
- Après le poste, par écouvillonnage des trois parties symétriques de l'autre côté de la carcasse. Cette opération a été renouvelée 10 fois sur 10 poulets différents.

Au total, 9 postes différents ont été ainsi examinés ; pour chacun d'eux, les lieux de prélèvements correspondants sont indiqués dans le tableau r. Après écouvillonnage, chacun des cotons tiges a été immédiatement placé dans un tube stérile contenant 20 ml de tryptone-sel. A l'arrivée au laboratoire, les cotons tiges ont été soumis à une agitation aussi vigoureuse que possible afin de récupérer dans le diluant le maximum de germes ; des dilutions décimales ont été effectuées à partir de la suspension ainsi obtenue et inoculées en double sur un milieu gélosé contenant tryptone 6 g, extrait de levures 3 g, agar-agar 15 g par litre, pH 7 :

- étalement en surface de 0,1 ml de chacune des dilutions,
- ensemencement en profondeur de 1 ml de chacune des dilutions.

Les boîtes ensemencées ont été incubées à 30°C pendant 3 semaines, conditions qui correspondent à celles que subissent normalement les carcasses ; ce facteur a déterminé le choix de ces conditions. Les dénombrements ont été effectués à partir des ensemencements en profondeur.

La détermination de l'importance relative des différents germes psychrotrophes pose également des problèmes d'ordre statistique. En effet, parmi les nombreuses espèces que l'on peut rencontrer, certaines, représentant un très faible pourcentage de la flore totale, peuvent n'être isolées que difficilement dans certains cas. C'est pourquoi, afin d'obtenir une bonne approximation des pourcentages respectifs, le plus grand nombre possible de colonies microbiennes ont été repiquées à partir des étalements effectués spécialement à la surface du milieu utilisé : ces conditions d'inoculation conviennent particulièrement à la reconnaissance, d'après la morphologie de leurs colonies, des différents germes présents.

En règle générale, 10 à 20 colonies par prélèvement ont été repiquées ; après purification, les souches ont été ensemencées en bouillon ordinaire puis, après développement à la température du laboratoire, les cultures ont été congelées.

Les identifications ont ainsi pu être étalées dans le temps ; au total 2 591 souches ont été identifiées d'après les critères classiques (**Buttiaux *et al.* 1969**) ; pour les bacilles Gram-négatifs, le schéma décrit par **Sean et Hodgkiss (1960a - 1960b)** et reproduit dans la **figure 1**, a plus particulièrement été utilisé.

Afin de traiter statistiquement les résultats obtenus, nous avons recherché à quelle loi générale ils pouvaient être rattachés ; des expériences préliminaires nous ont montré que les populations microbiennes contaminant les carcasses de poulets ne suivaient pas une loi « normale » mais qu'elles pouvaient être normalisées en transformant les données en logarithmes

décimaux. Par ailleurs, l'écart-type est généralement très grand en raison de grandes variations du niveau de contamination d'un animal à l'autre.

Cependant, pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons finalement choisi le test non paramétrique des différences de Wilcoxon, en conservant les chiffres bruts.

Tableau 6 : Correspondance entre les lieux de prélèvement et les postes étudiés sur la chaîne d'abattage

Numéro n°	Lieux de prélèvement		Poste
	Avant le poste	Après le poste	
1	Animaux vivants	Après saignée	Saignée
2	Après saignée	Après échaudage	Echaudage
3	Après échaudage	Après plumaison	Plumaison
4	Après plumaison	Après séchage	Séchage
5	Après séchage	Après passage dans la cire	Finition à la cire
6	Après passage dans la cire	Après refroidissement	Refroidissement
7	Après refroidissement	Après éviscération	Eviscération
8	Après éviscération	En fin de chaîne	Pliage et mise sur chariot
9	En fin de chaîne	Après 3h de ressuyage	Ressuyage

III.1.2.2 RÉSULTATS :

Les différents résultats obtenus ont été regroupés dans les tableaux 2, 3, 4 et 5.

Les deux premiers concernent l'évolution de la flore psychrotrophe en fonction des postes dans le tableau 6 les chiffres obtenus avant et après passage à un poste donné sont comparés du point de vue statistique (poste par poste) dans le tableau 7.

Les chiffres obtenus avec le lot de carcasses examinées sur leur deuxième côté après saignée donc après le poste n°1 ont été additionnés des chiffres obtenus avec le lot suivant des carcasses examinées sur leur premier côté après la saignée également mais avant le poste n°2 etc.

C'est-à-dire que pour chaque lieu de prélèvement, le nombre de carcasses examinées s'élève à 20 à l'exception des premiers et derniers, pour lesquels ce nombre est 10.

Tableau 7 : Evolution quantitative de la flore psychrotrophe en fonction des postes.

Poste n°	Lieux de prélèvement sur la chaîne	Germes psychrotrophes (3°C pendant 3 semaines)		
		Médiane	Amplitude	Valeurs de T et probabilité P.
1	Sujets vivants	583	110-10630	T=25 P>0,05
	Après électrocution et saignée	573	113-22700	
2	Après saignée	1030	60-9300	T=1 P<0,01
	Après échaudage	40	10-180	
3	Après échaudage	20	0-233	T=6 P<0,05
	Après plumaison	127	20-343	
4	Après plumaison	113	10-213	T=18 P>0,05
	Après séchage	87	20-173	
5	Après séchage	45	20-550	T=5 P<0,05
	Après passage dans la cire	13	6-73	
6	Après passage dans la cire	60	0-4700	T=20 P>0,05
	Après refroidissement	55	10-740	
7	Après refroidissement	55	0-9370	T=12,5 P>0,05
	Après éviscération	420	73-1216	
8	Après éviscération	122	3-800	T=0 P<0,01
	Fin de chaîne	902	286-6200	
9	Fin de chaîne	1358	410-14970	T=25 P>0,05
	Après 3h de ressuyage	1595	123-8530	

(Comparaison <<poste par poste>> des valeurs obtenues avant et après passage à un poste donné).

Test utilisé : test non paramétrique des différences de **WILCOXON**

Résultat obtenu sur 10 jours.

Tableau 8 : Répartition par types des souches isolées en fonctions des postes

	Sujet vivant	A Saignée	A Echaudage	A Plu mais on	A Séchage	A. Passage dans la cire	A. refroidissement	A. Eviscération	Fin de chaîne	A. ressuyage	Total
<i>Pseudomonas</i>	1	-	-	4	2	9	5	61	232	183	497
<i>Achromobacter</i>	127	246	109	25	23	12	22	14	19	7	604
<i>Flavobacterium</i>	30	43	9	1	12	61	20	31	26	12	245
<i>Acromonas</i>	-	1	1	8	-	1	-	-	-	-	11
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	6	-	1	7
<i>Microccocaceae</i>	-	25	4	4	2	-	3	6	1	1	46
<i>Corynebacterium</i>	9	5	2	196	210	71	86	49	63	8	699
<i>Bacillus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bactéries diverses</i>	-	-	4	12	12	4	6	8	3	-	49
<i>Levures</i>	-	-	1	4	9	31	50	202	98	37	432
Total	168	320	130	254	270	189	192	377	442	249	2591

	Sujet vivant	A Saignée	A Echaudage	A Pluma- ison	A Séch- age	A. Passage . dans la cire	A. refroidisse- ment	A. Eviscér- ation	Fin de chaîne	A. ressuy- age
<i>Pseudomonas</i>	0.6	-	-	1.6	0.8	4.8	2.6	16.2	52.5	73.5
<i>Achromobacter</i>	75.9	76.9	83.8	9.8	8.5	6.3	11.5	3.7	4.3	2.8
<i>Flavobacterium</i>	17.9	13.1	6.9	0.4	4.4	32.3	10.4	8.2	5.9	4.8
<i>Acromonas</i>	-	0.3	0.8	3.1	-	0.5	-	-	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	1.6	-	0.4
<i>Micrococcaeae</i>	-	7.8	3.1	1.6	0.8	-	1.6	1.6	0.2	0.4
<i>Corynebacterium</i>	5.4	1.6	1.5	77.2	77.8	37.6	44.8	13.0	14.3	3.2
<i>Bacillus</i>	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bactéries diverses</i>	-	-	3.1	4.7	4.4	21	3.1	2.1	0.7	-
<i>Levures</i>	-	-	0.8	1.6	3.3	16.4	26.0	53.6	22.2	14.9

Pourcentage des différents types des germes constituant la flore rencontrée à chaque poste.

NB : ces pourcentages ont été calculés à partir des chiffres indiqués dans le tableau 3.

A= après

Tableau 9 : Evolution quantitative de la flore psychrotrophe en fonction des postes (par 1 cm² de peau). En (3°c pendant 3 semaines)

Postes	Médiane	Amplitude
Sujet vivant	583 (1)	110-10630
Après électrocution et saignée	670 (2)	60-22700
Après échaudage	32 (2)	0-233
Après plumaison	128 (2)	10-343
Après séchage	62 (2)	20-550
Après passage dans la cire	12 (2)	0-4700
Après refroidissement	66 (2)	0-9370
Après éviscération	375 (2)	3-1216
Fin de chaîne	1115 (2)	286-14970
Après 3h de ressuyage	1595 (1)	123-8530

(1) Résultat obtenus sur 10 sujets.

(2) Résultat obtenus sur 20 sujets.

Les tableaux 4 et 5 concernent les souches isolées. Enfin, l'évolution quantitative et qualitative de la flore a été représentée graphiquement dans la figure 2 à l'aide des chiffres tirés des tableaux 3 et 5

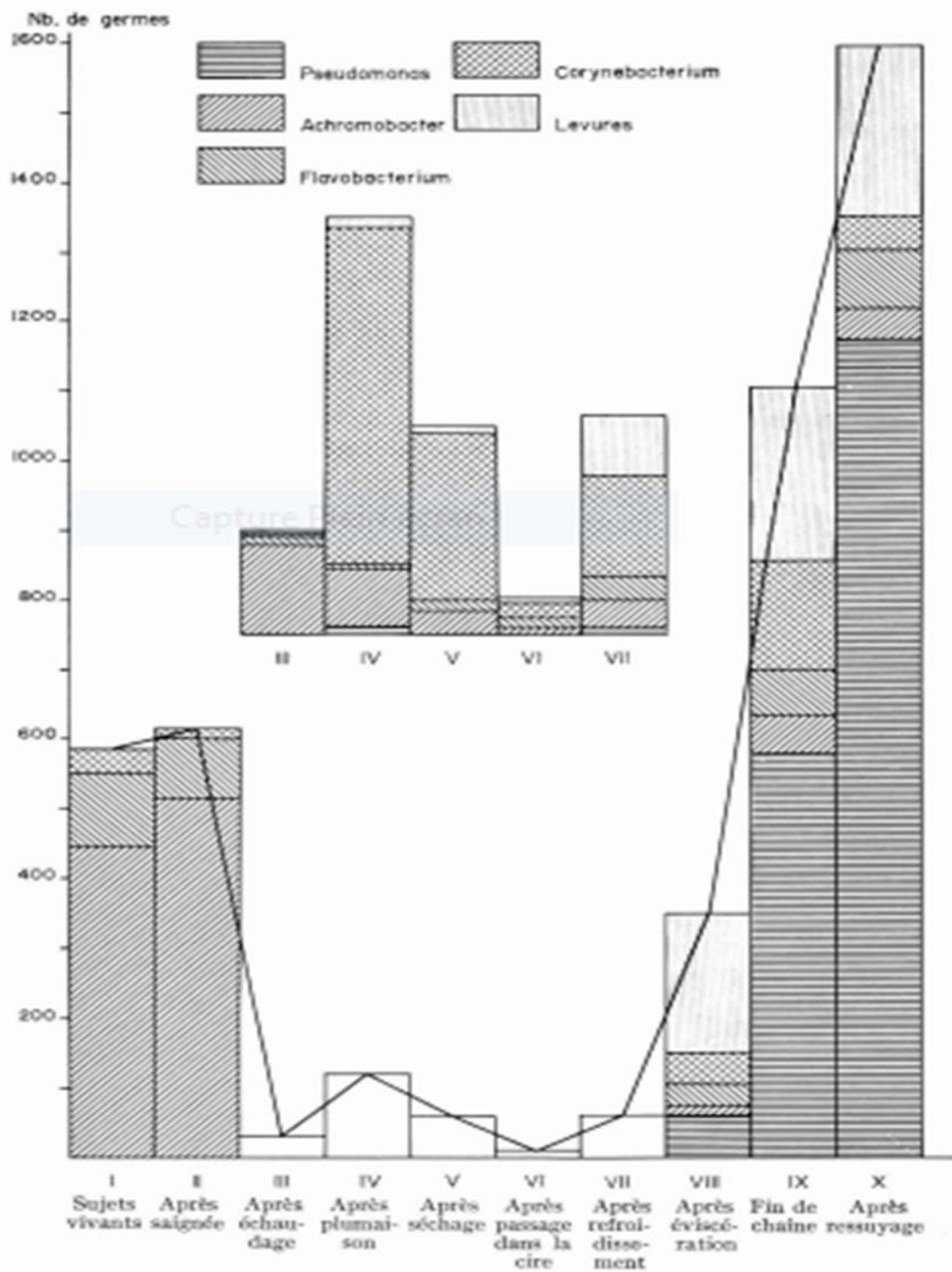


FIG. 2. — Évolution quantitative de la flore psychrotrophe en fonction des postes étudiés

Figure 3 : Evolution quantitative des flores Psychrotrophe en fonction des postes Etudiés

III.1.3 DISCUSSION

III.1.3.1 Évolution quantitative de la flore en fonction des postes

L'examen du tableau 2 permet de noter :

- Une diminution hautement significative de la flore après passage des sujets dans le bac d'échaudage.

Cette diminution est fonction d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques favorables ou défavorables : parmi les facteurs favorables la température de l'eau semble jouer le plus grand rôle, alors que, facteur défavorable, la pollution microbienne de cette eau peut contrebalancer, dans d'assez nombreux cas, l'effet microbicide de la température ;

- Une augmentation significative de la flore après passage des sujets dans les plumeuses. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait que la plumaison est réalisée grâce à l'action de doigts en caoutchouc, difficiles à nettoyer et à désinfecter ; ces doigts se chargent en germes au cours de l'opération et assurent ainsi un véritable ensemencement de la surface des carcasses ;
- Une diminution significative après passage des sujets dans le bain de cire. Ces constatations avaient déjà pu être faites au cours d'études antérieures effectuées dans d'autres abattoirs (**Lahellef et Meurier, 1970**),
- Une absence de modification de l'importance quantitative de la flore après séchage, contrairement à ce que nous avons observé antérieurement.
- Jusqu'à ce point de la chaîne, l'importance des contaminations est relativement faible, mais, après l'éviscération, on observe une augmentation marquée (fig. 2).
- Cet accroissement est en rapport direct avec la technique d'éviscération utilisée et les manipulations que subissent les carcasses : ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Barnes en 1959 qui avait montré que la flore psychrotrophe des volailles augmentait de façon importante au cours des manipulations ;
- Au total, sur la chaîne étudiée, le nombre des germes rencontrés est relativement faible, comparé à celui qui a pu être observé dans d'autres abattoirs. Il est à noter que les conditions d'hygiène dans lesquelles fonctionne l'abattoir étudié sont relativement bonnes et que, notamment, l'éviscération est réalisée pratiquement à sec.

III.1.3.2 Importance relative des différentes espèces rencontrées :

Compte tenu des conditions dans lesquelles les souches ont été sélectionnées, les microorganismes les plus fréquents pour l'ensemble des postes étudiés appartiennent, par ordre

décroissant, aux groupes suivants : *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et Levures (**tableau09**).

D'autres germes, en quantité nettement plus faible, ont également été rencontrés : *Micrococcaceae*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*.

Et parmi les bactéries diverses : *Xanthomonas* et bactéries lactiques (*Streptococcus diacetylactis* ; *Leuconostoc citrovorum* (**tableau09**).

Ces microorganismes évoluent de façon différente depuis le début jusqu'à la fin des opérations. C'est ainsi que :

a) Les *Pseudomonas* ne sont présents que très rarement et toujours en petit nombre sur les sujets vivants ; ils ne sont pas non plus très nombreux aux premiers postes de la chaîne.

Beaucoup d'entre eux paraissent être apportés au cours de l'éviscération, puisque, après cette opération, leur incidence s'accroît sensiblement et qu'ils sont retrouvés sur les deux tiers des sujets, alors qu'auparavant un seul sujet en était porteur.

En fin de chaîne et après ressuyage, on trouve des *Pseudomonas* en nombre important sur la quasi-totalité des volailles : ils paraissent donc bien être apportés par l'eau, les mains et le matériel ; Le pourcentage de *Pseudomonas* producteurs de fluorescéine sur le milieu B de King par rapport au nombre total de *Pseudomonas* isolés varie peu d'un poste à l'autre (70,9% après éviscération, en fin de chaîne, 68g% après ressuyage).

Par contre, au cours d'études non encore publiées, nous avons pu observer que l'incidence des souches pigmentées diminue nettement au cours de l'entreposage, confirmant en cela les travaux de Barnes en 1960. (**Barnes et Impey, 1968**).

b) Les levures évoluent tout au long de la chaîne de façon absolument identique à celle des *Pseudomonas*,

C'est-à-dire qu'elles ne sont présentes qu'en très petit nombre aux premiers stades et que leur incidence augmente après l'éviscération et en fin de chaîne, à la faveur des manipulations. Dans cette étude, nous n'avons pas retrouvé de levures sur les sujets vivants ; il n'est cependant pas impossible que, dans certains cas, il s'en trouve ; leur présence pourrait dépendre du mode d'élevage. Dans quelques cas, il semble s'établir un certain équilibre entre les *Pseudomonas* et les levures. En fin de compte, au cours de l'entreposage, ces dernières disparaissent totalement pour laisser la place aux premiers ;

c) Les *Achromobacter* sont les germes psychrotrophes les plus abondants sur les poulets vivants,

Ce qui confirme les résultats de (**Barnes, 1959**) qui montrait, de plus, que ces germes provenaient des litières profondes. Après échaudage, ils sont encore prédominants, mais leur nombre baisse en valeur absolue, ce qui est normal après ce traitement ; ultérieurement, leur incidence devient faible : ils sont remplacés par d'autres germes ;

d) les *Corynebacterium* sont isolés en grand nombre mais, si l'on considère l'ensemble de la chaîne, leur incidence est relativement faible ; en effet, ils ne sont très nombreux qu'après la plumaison et le séchage où ils constituent, à eux seuls, la majeure partie de la flore ; ensuite, leur incidence décroît régulièrement.

Leur origine est, très probablement, la même que celle des *Achromobacter* car 93.7% des souches isolées présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que les *corynebactéries* des litières de poulaillers, décrites par (**SHEFFERLE, 1966**)

e) Ces germes, les plus nombreux parmi cette flore des litières, peuvent, grâce à leur uréase, transformer l'urée en ammoniac, et contribuer ainsi à l'alcalinisation de ce substrat. Leur nombre est cependant peu élevé sur les animaux vivants et l'opération de la plumaison leur permet de se multiplier largement au point de devenir les germes les plus nombreux à ce moment ; les conditions habituelles de conservation ne leur permettent pas ensuite de se développer, et cela d'autant moins qu'ils se trouvent en compétition avec les *Pseudomonas* ;

f) Les *Flavobacterium* ont été retrouvés régulièrement mais toujours en petit nombre tout au long de la chaîne de l'abattoir étudié. Leur rôle semble secondaire ;

g) Les autres types de germes ne représentent qu'une partie infime de la flore psychrotrophe :

Des *Micrococcaceae* ont été rencontrés à tous les stades de la chaîne, des *Enterobacteriaceae* après éviscération, des *Aeromonas* et des *Xanthomonas* sur quelques

Il faut noter la présence de bactéries lactiques (*Streptococcus diacetyactis* et *Leuconostoc citrovorum*) rencontrées exclusivement après plumaison et après séchage.

Au total, on observe, lors de la préparation des carcasses de volailles, au départ, une prédominance des *Achromobacter*, suivie d'une multiplication importante des *Corynebacterium*, pour finalement voir les *Pseudomonas* et les *levures* devenir les plus nombreux ; il en va tout autrement au cours de la conservation des viandes de porc et de

bœuf, où les germes dominants sont les *Achromobacter* pour les carcasses de porc et les *Pseudomonas* pour les carcasses de bœuf (Catsaras et Grebot, 1969).

III.2 Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle

Protocole réalisé par (Dumont et al., 1977)

Matériel et méthodes :

III.2.1 Echantillons :

Les essais de fromagerie ont été réalisés en utilisant des laits de grand mélange présentant initialement une bonne qualité bactériologique et conservés à l'état cru à + 5°C de façon à laisser une flore psychrotrophe plus ou moins importante se développer.

Après des temps de report de 2j ; 6 j et 9j. Le lait a été pasteurisé à 72°C et on a réalisé des fabrications de pâtes molles du type Camembert qui ont été affinées durant 35 j. Les fromages ont alors été soumis à un jury de dégustation qui a noté leur texture et leur goût. Les échantillons destinés aux analyses ont été immédiatement congelés et conservés à – 30°C.

Différents dosages ont été effectués sur ces fromages :

- extrait sec (ES), teneur en matière grasse (MG), rapports gras/sec (GS) et eau/ESD en sortie de saumure et en fin d'affinage ;
- pH et teneur en NaCl à la sortie de saumure ;
- azote total et azote soluble à l'alun à l'issue de l'affinage.

III.2.2 Analyse :

III.2.2.1 Analyses bactériologiques :

La flore totale et la flore psychrotrophe ont été dénombrées sur milieu PCA après incubation à 30°C pendant 3 j et à 7°C pendant 10 j respectivement.

- ✓ Mesure de la lipolyse La matière grasse est obtenue par centrifugation du fromage (centrifugeuse Serval SS34, 32 000g, 30mn).

On dissout 1 g de matière grasse dans 10 ml d'un mélange éthanol : éther éthylique 1.1 et on titre son acidité libre avec de la potasse alcoolique 0,01 N en présence de phénolphaléine.

Les acides gras libres ont été dosés par une méthode colorimétrique (**Lauwerys, 1969**) à partir d'une suspension de fromage dans l'eau obtenue à l'aide d'un Ultraturrax.

- ✓ Dosage des composés monocarboxylés totaux Les composés monocarboxylés totaux ont été isolés et dosés sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones.
- ✓ Extraction des composés volatils

Les composés volatils ont été extraits par une méthode de distillation sous vide poussé,

A l'issue de la distillation le contenu des pièges est amené à pH 9,0 par addition de soude normale et les composés neutres sont extraits par du Fréon 11, puis par du dichlorométhane.

Les extraits Fréon et dichlorométhane ainsi obtenus ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse, couplée à un spectromètre de masse AEI MS 20 organique par un séparateur à membrane.

Les analyses sont effectuées en utilisant une programmation de température entre 30° C et 130°C à raison de 1,50/mn après une période isotherme à 30° C.

Les composés volatils contenus dans les distillats aqueux correspondant à 50 g de fromage ont été étudiés par une méthode de Head Space à partir d'un volume de 500ml et en utilisant une colonne capillaire en verre de 80 m de même nature que celle utilisée en couplage. Les composés soufrés ont été étudiés de manière analogue.

III.2.3 RESULTATS :

III.2.3.1 Analyse du lait cru :

Le tableau 11 donne les résultats des dénombrements effectués sur le lait cru après conservation pendant 2 j, 6 j et 9 j à + 5° C. On peut voir que la flore psychrotrophe devient rapidement dominante.

III.2.3.2 Analyse des fromages :

Nous avons rassemblé dans les tableaux 12 et 13 les résultats analytiques concernant les fromages en sortie de saumure et après affinage.

On remarquera que la conservation du lait à basse température entraîne une diminution notable du pourcentage d'affinage (défini comme le rapport de la surface de la zone apparaissant affinée à la surface totale de la coupe).

Tableau 10 : Analyse du lait cru

	Coliformes	Germes totaux	Germes psychrotrophes
48h	570	63x10 ³	12x10 ²
6j	13x10 ³	91x10 ⁴	94x10 ⁴
9j	29x10 ⁴	63x10 ⁴	44x10 ⁴

Tableau 11 : Analyse des fromages sortie saumure

	ES	MG	G/S	Eau/ESD	Ph	NaCl
48h	44.83	21.50	47.96	2.36	4.45	-
6j	44.83	21.37	47.68	2.35	4.63	2.02
9j	45.83	22.12	48.28	2.28	4.60	1.87

Tableau 12 : Analyse des fromages sortie à 35j

	ES	MG	Ph	G/S	Eau/ESD	N total	N soluble	P. 100 Affin
48h	49.46	24.75	6.92	50.04	2.04	3.33	0.72	80
6j	46.85	23.25	6.74	49.63	2.25	3.23	0.75	70
9j	48.46	24.50	6.51	50.56	2.15	3.24	0.77	40

Notes de dégustation (tableau14) :

Les notes globales de texture et de goût baissent avec l'allongement de la conservation au froid. La texture est plus compacte et moins onctueuse dans les fromages fabriqués avec du lait gardé longtemps au froid. Ces fromages sont plus amers et deviennent très rances. On notera l'absence de caractère ammoniacal.

- L'examen des profils chromatographiques montre une évolution très nette (fig. 4).

On peut tout d'abord constater une augmentation de la surface des pics correspondant aux méthyl cétones en particulier des termes à longue chaîne saturée (2-octanone, 2-nonanone, 2-décane, 2-undécane, 2-dodécane, 2-tridécanone) ou insaturés (2-nonénone, 2-undécénone, 2-tridécénone).

Tableau 13 : Résultat globale concernant la texture et le gout du lait

		48h	6j	9j
	Note globale/5	3.25	3.25	3.00
Texture	Appréciation :			
	Onctueuse	Modéré	Faible	Absence
	Fondante	Modéré	Modéré	Faible
	Plâtreuse	Absence	Absence	Faible
	Collante	Faible	Faible	Faible
	Granuleuse	Absence	Seuil	Faible
	Compacte	Absence	Faible	Modéré
	Note globale/5	2.50	1.83	1.70
Gout	Appréciation :			
	Amer	Modéré	M	Fort
	Piquant	Faible	S	Faible
	Moisi	Absence	F	Faible
	Rance	Absence	M	Fort
	Ammoniacal	Faible	F	Absence
	Acide	Seuil	A	Faible

Cette augmentation est confirmée par les dosages colorimétriques puisqu'il apparaît (tableau15) que les valeurs passent de 2,76 à 16,52 μ m pour les échantillons fabriqués avec des laits conservés respectivement 2 j et 9 j à 5° C. Corrélativement on note une forte augmentation des

alcools secondaires à nombre impair de carbone qui est toutefois beaucoup plus importante pour le 2-heptanol que pour ses homologues supérieurs.

Tableau 14 : Composés mono carbonyles totaux pour 100 g de fromage.

2j	2.76 μ m	6j	14.08 μ m	9j	16.52 μ m
----	--------------	----	---------------	----	---------------

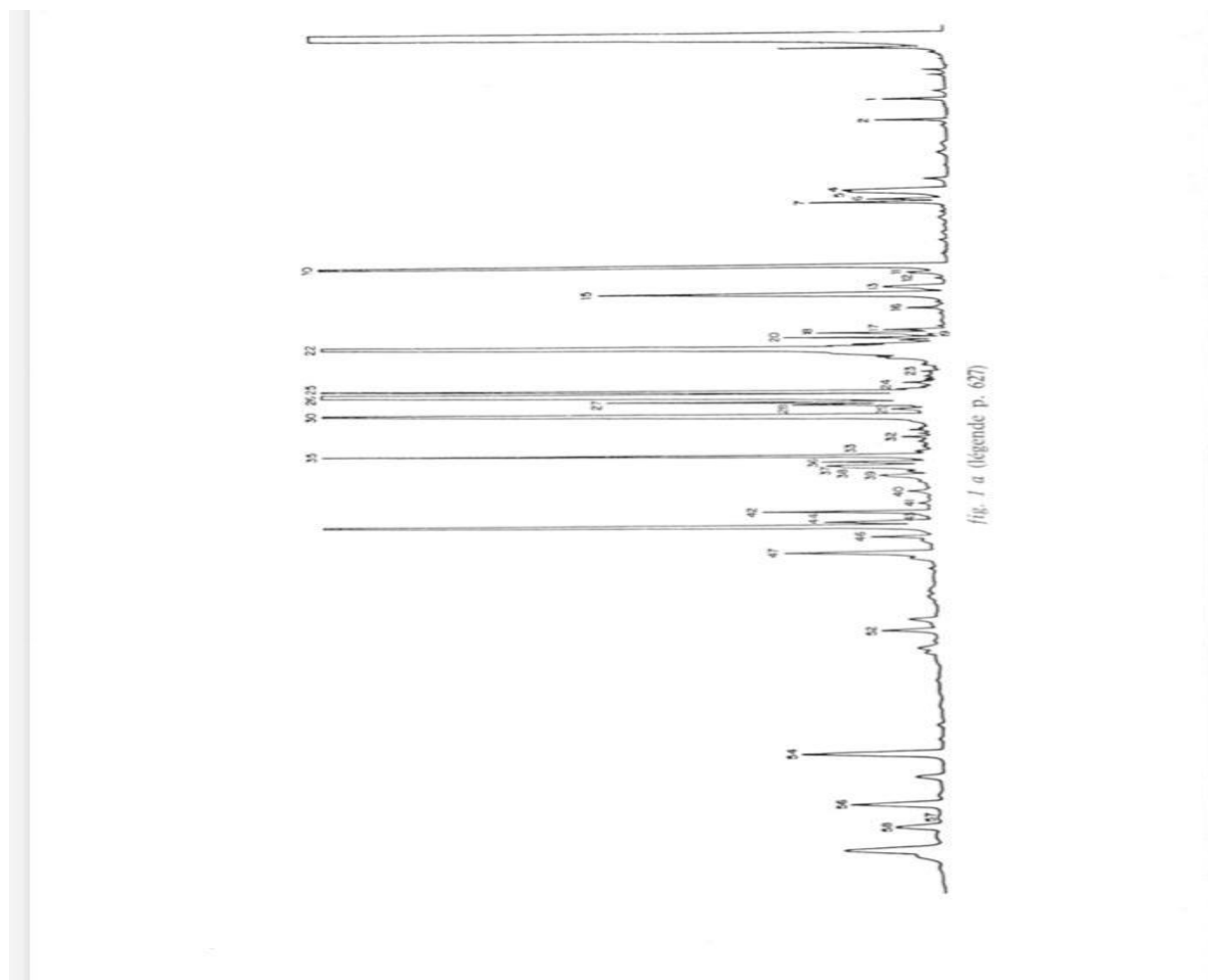


Figure 4 : Analyse chromatographique correspond aux méthyl cétone. (Dumont J.P. 1977).

On notera que la 3-octanone ne subit pas pour sa part de variations notables, pas plus que les teneurs en alcools primaires et en esters.

L'octen-1-ol-3 et le 1,3-diméthoxybenzène toutes deux caractéristiques des fromages à pâtes molles ne varient guère d'un échantillon à l'autre.

L'examen des profils chromatographiques obtenus par la méthode de Head Space confirme les résultats et permettent de vérifier que les teneurs élevées en 2-pentanone et 2-pentanol qui apparaissent dans l'échantillon intermédiaire ne sont pas dues à un artefact.

L'analyse des extraits dichlorométhane a permis de constater que l'on ne trouve des quantités importantes d'acétoïne que dans les fromages fabriqués avec des laits ayant subi un report court.

- Les résultats de la mesure de l'acidité libre de la matière grasse (**tableau16**)

Montrent une croissance régulière des acides gras libres à courte chaîne tandis que (**tableau17**) les acides gras libres à longue chaîne suivent une évolution inverse.

- Analyse des produits soufrés :

Les composés soufrés sont peu abondants dans les fromages étudiés ce qui est inhabituel pour des pâtes molles. Seuls ont été décelés l'hydrogène sulfuré, le sulfure et le disulfure de méthyle qui sont présents en quantités encore plus faibles dans les échantillons fabriqués avec le lait le plus âgé.

Tableau 15 : Indice d'acidité de la matière grasse (ml NaOH 0.01 N/g)

2j	5.5	6j	6.5	9j	9.8
----	-----	----	-----	----	-----

Tableau 16 : Acide gras libres (μeq acide palmitique pour 5g de fromage).

2j	1260	6j	1200	9j	500
----	------	----	------	----	-----

III.2.4 DISCUSSION :

Les travaux décrivant l'action lipolytiques des psychrotrophes sont nombreux aussi n'est-il pas étonnant de constater en premier lieu l'apparition d'un goût de rance qui va de pair avec une augmentation de l'acidité de la matière grasse. Plus originale est la très forte augmentation des teneurs en méthylcétones qui n'avaient jamais été rapportées jusqu'alors. Pourtant cette augmentation n'est pas surprenante puisque ces méthyl cétones sont formées à partir des acides gras libres libérés par les lipases ce qui explique que l'on constate une baisse de teneur en acides gras libres à longue chaîne dans les échantillons à forte teneur en composés carbonylés. Ces méthyl cétones sont à leur tour réduites en alcools secondaires, et il est bien probable que les défauts de goûts constatés sont dus à la conjonction des acides gras libres, des méthyl cétones et des alcools secondaires d'autant que ces derniers étant à longue chaîne (C_a à C_b) ils ont des seuils de perception de même ordre de grandeur que celui des méthyl cétones.

On peut en outre remarquer que dans les échantillons où la matière grasse est la plus dégradée on voit apparaître des cétones insaturées en quantités très supérieures à la normale (2-nonénone) et même des méthylcétones insaturées qui n'avaient jusqu'alors été isolées (2-tridécénone). Cette remarque vaut également pour les méthyl cétones à nombre pair d'atomes de carbone qui apparaissent ici à des teneurs dépassant même celles de fromages bien affinés fabriqués au lait cru.

En ce qui concerne les esters on ne note aucune différence entre les échantillons alors que l'on aurait pu s'attendre à voir apparaître des esters éthyliques dans les fromages fabriqués avec des laits à forte population de psychrotrophes compte tenu des observations de (**HOSONO et al. 1974**) sur l'aptitude de ces micro-organismes à produire ces esters.

L'absence de goût ammoniacal remarqué à la dégustation, la texture, la faible quantité de produits soufrés, en particulier l'absence de 2,4-dithiapentane, et enfin, le fait que les produits volatils résultant de la dégradation des protéines ne soient pas plus abondants dans les échantillons issus de laits conservés le plus longtemps au froid confirment l'observation faite sur la coupe du fromage et qui montre que ces fromages s'affinent mal.

On peut tout d'abord invoquer l'absence de flore bactérienne protéolytique de surface résultant de la technologie utilisée mais aussi le rôle inhibiteur des acides gras libres sur la croissance des bactéries normalement responsables de la protéolyse. Ceci n'est pas incompatible avec l'activité protéolytique des bactéries psychrotrophes observée par divers auteurs (**Kjuru et al. 1971**).

Il ne serait pas impossible en effet que ces bactéries ne dégradent les protéines que jusqu'à un stade intermédiaire étant ainsi responsables de l'apparition de produits amers. Ces derniers ne sont pas ultérieurement dégradés du fait de l'inhibition des bactéries lactiques.

Notons enfin que (**Law et al. 1976**) travaillant, il est vrai, sur le Cheddar, restent muets quant au ralentissement de la protéolyse dans des fromages où ils observent un rancissement important dû aux psychrotrophes.

Notons enfin que seul l'échantillon fabriqué à partir de lait peu contaminé contient de l'acétoïne ce qui traduit le caractère réducteur des psychrotrophes.

On peut remarquer qu'il n'y a pas de variation dans les teneurs de deux métabolites très caractéristiques des pâtes molles le 1-3- diméthoxybenzène et l'octen-1-ol-3 ce qui peut s'expliquer, pour ce dernier du moins, par le fait qu'il résulte de l'activité du *Penicillium* qui joue un rôle principal dans l'affinage des pâtes molles de lait pasteurisé.

Tous ces résultats dont certains sont nouveaux sur le plan analytique ne font, au fond, que confirmer une fois encore qu'il existe une relation étroite entre la bonne ou la mauvaise qualité bactériologique du lait et la bonne ou mauvaise qualité des produits préparés à partir de ce lait.

De plus ils montrent que les phénomènes biochimiques responsables de défauts graves peuvent apparaître avant même que la population psychrotrophe n'ait dépassé le seuil parfois considéré comme critique de 1 million de germes.

III.3 Thermorésistance des bactéries psychrotrophes du lait cru et de leurs protéinases :

Protocole réalisé par (Mottar J., 1984)

Matériel et méthodes

III.3.1 Isolation et identification de micro-organismes protéolytiques psychrotrophes :

Du lait cru a été étalé sur un milieu de caséinate (Peck, 1976) et incubé 10 jours à 7° C. Les colonies nettement protéolytiques ont été sélectionnées et purifiées par des repiquages successifs, suivis d'incubation à 21°C. Les cultures purifiées ont été conservées à 7° C sur Nutrient Agar incliné (NA).

➤ Une classification des souches protéolytiques a été faite sur la base de :

Coloration de Gram, mobilité, test d'oxydase de Kovac, conversion du glucose, formation de pigment, conversion du lactose, assimilation du citrate, réduction du nitrate, conversion de l'arginine, assimilation de l'amidon et hydrolyse de la gélatine (Buchanan et Gibbons, 1974).

III.3.2 Production, isolation et purification partielle de protéinases bactériennes thermostables :

Les bactéries psychrotrophes isolées ont été incubées 72 h à 21° C sur NA, puis transvasées 2 fois à l'aide de 1ml de solution physiologique stérile dans 100ml de Nutrient Broth. Ces cultures ont été incubées avec agitation pendant 72 h à 21° C.

Après incubation, les cellules bactériennes ont été séparées par centrifugation à 10000 g pendant 15 min à 4° C.

Après filtration stérilisante sur membrane avec une porosité de 0,45 μ m, le liquide surnageant, contenant les protéinases exocellulaires, a été concentré 10 fois à l'aide de modules d'ultrafiltration Millipore CX-IO à limite nominale d'exclusion de 10000 daltons.

Les solutions d'enzymes à conserver étaient stérilisées par filtration ; ces solutions d'enzymes concentrées étaient ensuite conservées à 5° C.

Une purification partielle des enzymes a été obtenue par précipitation au $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (saturé à 50 % ; 372 g/l), après quoi le mélange était gardé 12 h à 7° C (**Marshall et Mars tiller, 1981**).

Le précipité était séparé par centrifugation (20 000 g) et redissous dans 20 ml d'eau bidistillée stérile. Les sels étaient éliminés par dialyse pendant 24 h à 5° C en présence d'eau.

L'échantillon était ensuite dialysé pendant 24 h dans un tampon phosphate de 0,1 M, pH 7,5.

La solution d'enzyme, partiellement purifiée, était finalement filtrée sur un filtre à membrane de porosité 0,45µm et conservée à 5° C.

III.3.3 Chauffage de suspensions bactériennes :

Des cultures fraîches, obtenues sur milieu NA, des bactéries protéolytiques isolées ont été transvasées, à l'aide d'une solution physiologique stérile, dans du lait écrémé stérile. On veillait à ce que le nombre de germes initial soit de 10^6 - 10^7 /ml.

Des portions de 1 ml ont été rapidement portées à la température voulue dans un bain-marie bouillant, puis maintenues pendant un temps déterminé à cette température, également en bain-marie.

Les temps de chauffage requis pour atteindre des températures situées entre 50 et 60° C étaient inférieurs à 10s. Ils n'ont pas été pris en considération dans l'expression du temps de chauffage. Les températures étaient contrôlées à l'aide d'un thermomètre à thermocouple.

Le refroidissement dans l'eau glacée avait lieu immédiatement après la période de chauffe.

III.3.4 Chauffage des solutions d'enzymes protéolytiques :

Pour déterminer si une protéinase faisait preuve d'un certain degré de résistance à la chaleur, 0,5 ml de solution d'enzyme non purifiée était placée dans une éprouvette, puis immergée pendant 5 min dans un bain d'huile à 100°C.

L'activité enzymatique était déterminée avant et après le chauffage.

Pour l'étude de l'inactivation thermique des protéinases P 104 et P 108, des portions de 100µl de filtrat d'enzymes partiellement purifiées ont été introduites dans des éprouvettes (diamètre intérieur : 2 mm ; diamètre extérieur : 3 mm), qui furent ensuite fermées à la flamme, puis chauffées, dans un bain d'huile, à des températures situées entre 100 et 150°C.

Et, enfin, rapidement refroidies dans de l'eau glacée. Le temps de chauffage du liquide, mesuré par un thermocouple, était de 10 à 25s et n'a pas fait l'objet d'une correction.

III.3.5 Détermination de l'activité protéolytique :

L'activité protéasique a été déterminée par mesurage de la libération de p-nitroaniline (pNA) d'un substrat tripeptidique, composé d'H-D-Ile-Pro-Arg. PNA.

Dans ce but, 300 µm d'une solution d'enzyme est pipetée dans une cuvette thermostatée. Le tout est chauffé à 37°C.

Ensuite, on ajoute 300 µm d'une solution tampon pH 7,4 (6,1 g tris (hydroxy méthyl) aminométhane et 0,7 g NaCl/L eau bi distillée), préchauffée à 37° C.

Après mélange on ajoute 300 µm de la solution du substrat (4,5 mol/l H-D-Ile-Pro-Arg.-pNA-2HCL) et on mesure immédiatement la densité optique à 405 nm.

Le témoin est constitué de 300 µm d'eau, 300 µm de solution tampon et 300 µm de solution de substrat. L'évolution de la densité optique est suivie pendant 10 min.

L'activité protéasique est déduite de l'augmentation de l'adsorption (da) par unité de temps (min) et est expérimentée.

III.3.6 RESULTATS ET DISCUSSION :

III.3.6.1 Sélection des bactéries psychrotrophes productrices de protéinases :

Douze (12) cultures fortement protéolytiques et dont le liquide surnageant manifestait encore nettement une activité protéolytique après 5 min de chauffage à 100°C, ont été isolées du lait cru réfrigérer.

Il est apparu que 6 d'entre elles appartenaient au genre *Pseudomonas* et 6 au genre *Flavobacterium*.

Nos résultats démontrent que, conjointement aux *Pseudomonas* spp. Il existe d'autres bactéries psychrotrophes, comme *Flavobacterium* spp. Capables de produire des protéinases extracellulaires thermostables.

Ceci est confirmé par les observations de Griffiths, (**Phillips et Muir, 1981**), qui ont trouvé qu'une partie significative des psychrotrophes dans le lait cru est composée de bactéries autres que *Pseudomonas* spp. Et qui sont tout aussi capables de produire des enzymes thermostables. (**Kishon ti, 1975**) démontrait que 24 des 60 bactéries psychrotrophes, isolées à partir de lait cru, produisaient des protéinases extracellulaires conservant au moins 75 % de leur activité

après un traitement de chauffage de 30 min à 63°C et appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Achromobacter*.

➤ Thermorésistance des cultures psychrotrophes de «*Pseudomonas*» P 104 et «*Flavobacterium*» P 108

Les protéinases de 2 souches : *Pseudomonas* P 104 et *Flavobacterium* P 108 se sont révélées les plus résistantes à la chaleur. Ces cultures et leurs enzymes ont été retenus pour examen ultérieur.

L'inactivation des cultures psychrotrophes de *Pseudomonas* P 104 et *Flavobacterium* P 108 par la chaleur entre 50 et 60°C suit une réaction du premier ordre (fig. 1 a et 1b).

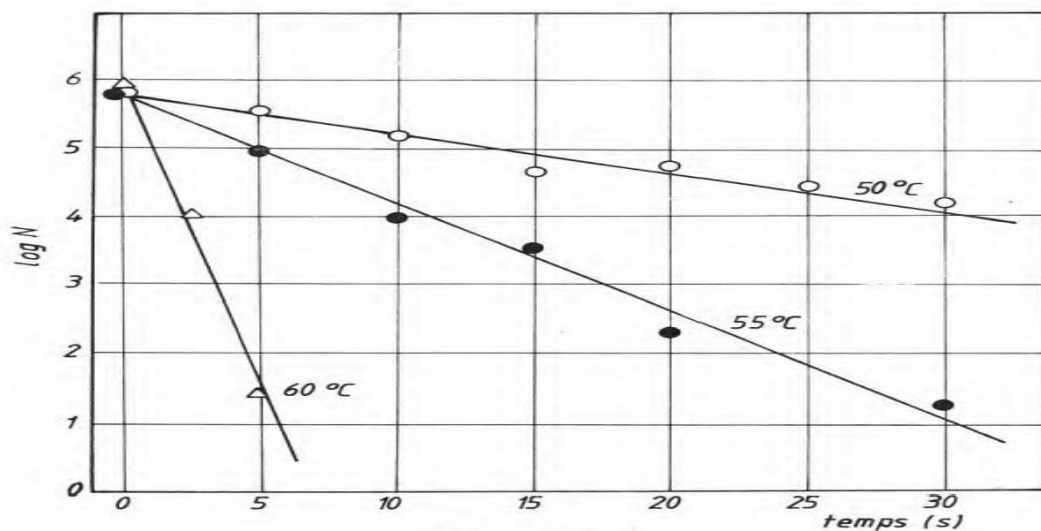


Figure 1 a

Inactivation thermique de la souche *Pseudomonas* P 104.

Figure 5 : Inactivation thermique des souches de *Pseudomonas* P 104

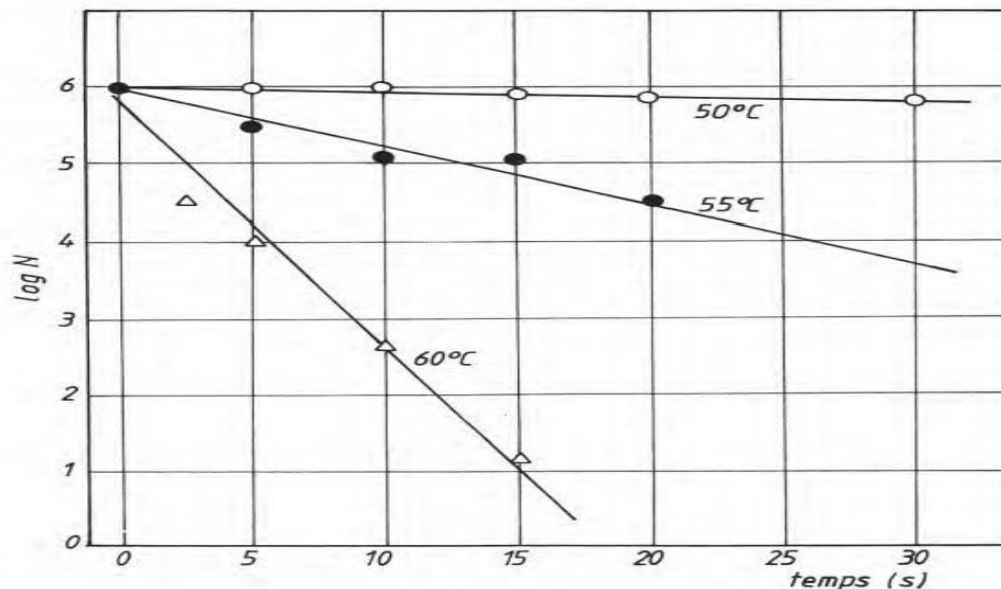


Figure 1 b

Inactivation thermique de la souche *Flavobacterium* P 108.

Figure 6 : Inactivation de la souche *Flavobacterium* P 108.

Les données obtenues permettent de calculer la relation entre le temps de réduction décimale D et la température T (°C). Ces équations se présentent respectivement comme suit :

- *Pseudomonas* P 104 : $\log D = 7,7142 - 0,1273T$ ($r = - 0,996$) ;
- *Flavobacterium* P 108 : $\log D = 10,6790 - 0,1706 T$ ($r = - 0,983$).

Partant de ces données, on peut calculer, pour l'intervalle de température de 50 à 750 C, les temps de réduction décimale D et les constantes d'inactivation k ($2,303/D$), ainsi que la valeur de thermorésistance z, c'est-à-dire la variation de température nécessaire pour obtenir l'augmentation au décuple ou la diminution au dixième de la valeur D, et le coefficient de température Q_{10} .

Les paramètres cinétiques calculés pour les deux souches bactériennes en cause sont reproduits dans le tableau 18 :

Des données bibliographiques donnent des valeurs D et z pour plusieurs *Pseudomonas* spp. (**Kaufmann et al., 1954**) a calculé par extrapolation que les valeurs D à 71,10 C, pour différents *Pseudomonas* spp. Sont comprises entre 0,0001 et 0,324 s. Les valeurs z pour les *Pseudomonas* spp, se situent entre 3,7 et 7,9°C (**Cogna, 1979**).

Tableau 17: paramètres cinétiques pour l'inactivation thermique des cellules entières de *Pseudomonas* P 104 et *Flavobacterium* P 108. (**Kaufmann et Cogna, 1979**).

Souches bactérienne	T (°c)	D (s)	K (s ⁻¹)	Z (°c)	Q ₁₀
<i>Pseudomonas</i> P 104	50	21.26	0.108	7.85	18.8
	55	5.16	0.446		
	60	1.19	1.931		
	65	0.27	8.367		
	70	0.063	36.23		
	75	0.015	156.9		
<i>Flavobacterium</i> P 108	50	140.92	0.016	5.90	50.1
	55	19.72	0.117		
	60	2.77	0.830		
	65	0.39	5.920		
	70	0.05	42.20		
	75	0.007	300.8		

- D = Temps de réduction décimale
- k = Constante d'inactivation
- z = Valeur de thermorésistance
- Q₁₀= Coefficient de température

Les grandeurs cinétiques, trouvées pour *Pseudomonas* P 104 ainsi que pour *Flavobacterium* P 108, semblent être en concordance avec les données bibliographiques pour *Pseudomonas* spp.

La thermorésistance des microorganismes gram-négatifs psychrotrophes se révèle très faible.

Si l'on admet, comme il est généralement admis, qu'un processus de chauffage exerçant un effet destructeur équivalent à 10 valeurs D suffit pour exterminer totalement les bactéries

présentes, on peut déduire des données acquises qu'une destruction totale des bactéries en cause est obtenue par chauffage de 30s à 60° C ou de 5s à 65° C ou de 1 s à 70° C.

Des chauffages de ce genre sont dès lors également indiqués pour le lait cru que l'on ne soumet pas au traitement UHT aussitôt après son arrivée à la laiterie.

III.3.6.2 Thermorésistance des protéinases bactériennes exocellulaires :

Dans l'intervalle de température 100-150° C, l'inactivation thermique des protéinases exocellulaires de *Pseudomonas* P 104 et de *Flavobacterium* P 108, déterminées sur le surnageant de culture concentré et dialysé se produit selon une cinétique de réaction du premier ordre (fig. 2 a et 2 b).

Elle montre que ces enzymes sont nettement thermostables.

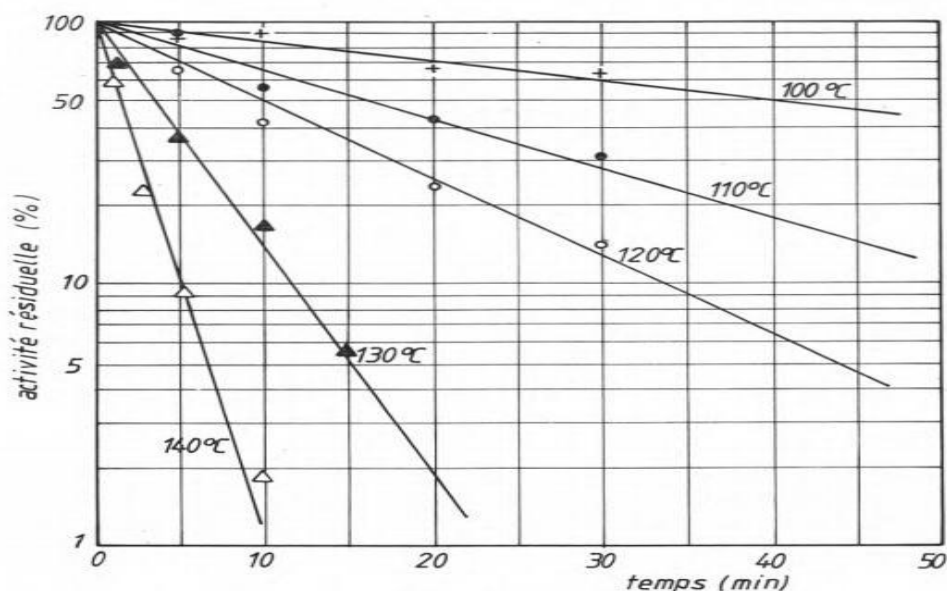


Figure 2 a
Inactivation thermique de la protéinase P 104.

Figure 7 : Inactivation thermique de la protéine P 104

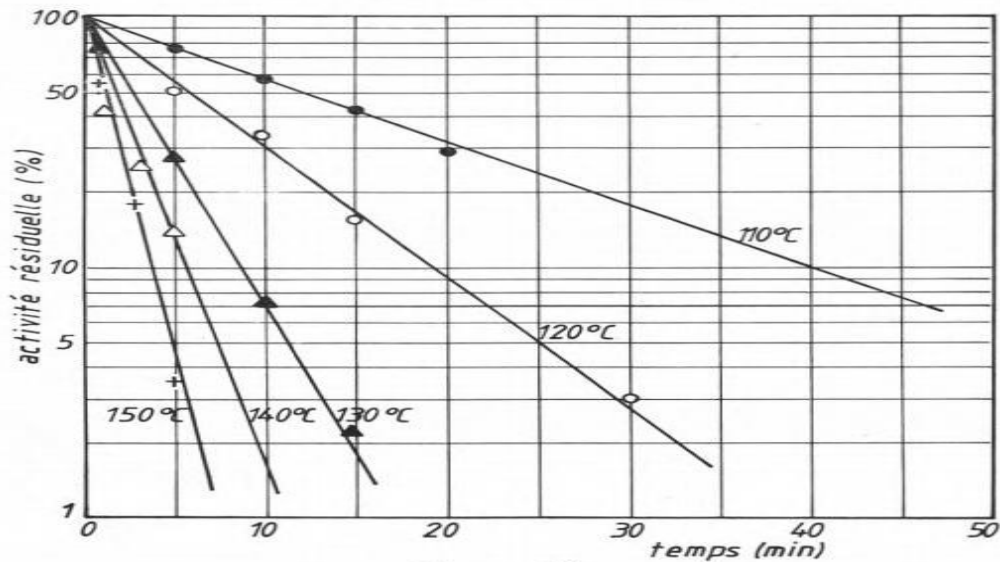


Figure 2 b
Inactivation thermique de la protéinase P 108.

Figure 8 : Inactivation de protéinase P 108

Pour les deux enzymes en question, la relation entre la température T (°C) et le temps de réduction décimale D, pour l'intervalle de température susdit, peut être représentée par une droite :

- protéinase de P 104 : $\log D = 5,7380 - 0,0359 T$ ($r = -0,996$),
- protéinase de P 108 : $\log D = 4,5741 - 0,0273 T$ ($r = -0,992$). De même que pour les cellules, des grandeurs cinétiques utiles ont été calculées (tableau 19).

La résistance à la chaleur des enzymes étudiées ici est telle que celles-ci peuvent résister pleinement ou en grande partie à un traitement URT.

Les valeurs z, publiées pour des souches de *Pseudomonas*, sont comprises entre 20 et 44,5°C (Mayer Hofer et al. 1981).

Nos données concordent avec celles mentionnées dans ces références.

Il apparaît que l'inactivation des protéinases bactériennes thermorésistantes de P 104 et P 108 par la chaleur évolue, dans l'intervalle de température 100 - 150°C, conformément à la théorie d'Arrhenius.

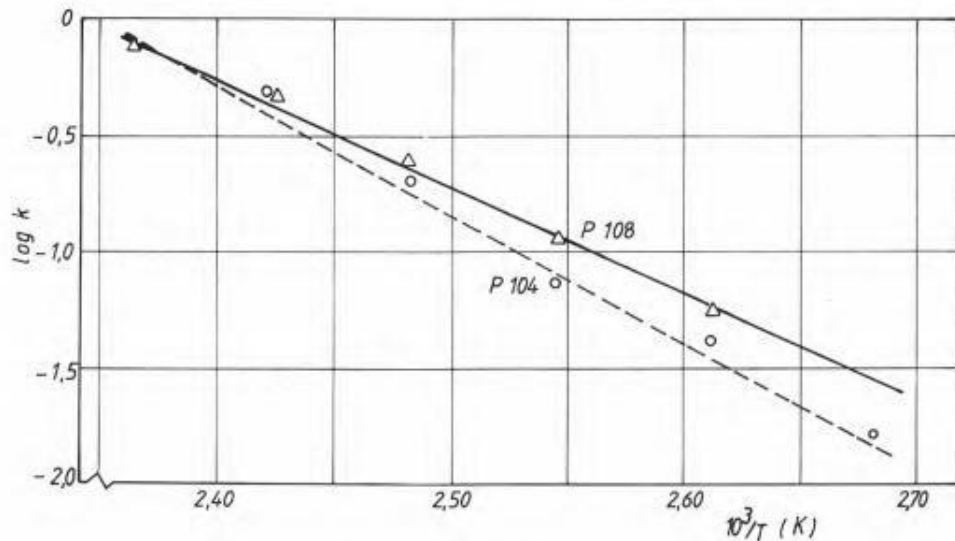


Figure 3

Figure 9 : Inactivation thermique des protéinases P 104 et P 108

(Représentation d'Arrhenius).

[k = pente des droites obtenues en exprimant log (activité résiduelle) en fonction du temps de chauffage (fig. 2 a et 2 b)].

En effet, comme il ressort de la figure 8, le rapport entre log k et 1/T est linéaire et peut être exprimé par une équation de la forme :

- $k = I.E. (-E/RT)$

Où k = constante de vitesse (min^{-1})

- A = constante
- E = énergie d'activation (J.mol^{-1})
- R = constante de gaz ($8,31 \text{ J.mol}^{-1}$)
- T = température absolue (K).

Les équations d'Arrhenius suivantes ont pu être calculées pour l'inactivation des protéinases examinées :

P 104 : $\log k = 12,582 - 5,365.103/T$ ($r = 0,996$),

P 108 : $\log k = 10,398 - 4,451.103/T$ ($r = 0,993$).

De telles équations peuvent être utilisées pour prédire l'effet d'un traitement thermique sur l'activité des protéinases extracellulaires bactériennes dans le lait.

Il est important d'éviter la formation de protéinases thermorésistantes dans le lait, d'autant plus lorsque le lait est destiné à la production de produits URT qui devront se conserver pendant une période relativement longue à température ambiante, car même un traitement URT intensif ne peut pas inactiver totalement ces enzymes.

Conclusion Générale :

III.4 Conclusion Générale :

Au cours de l'analyse de ces thèses effectués dans les trois laboratoires différents nous pouvons dire dans un premier temps que l'étude quantitative de la flore psychrotrophe sur le long de la chaîne d'abattage nous montre que celle-ci évolue de façon caractéristique suivant : une diminution après échaudage, une augmentation après plumaison, une nouvelle diminution après passage dans la cire, et une nouvelle augmentation très marquée après éviscération. Cette évolution est générale pour les abattoirs de volailles et d'ailleurs conforme à la logique ; mais l'intensité des variations observées, notamment les augmentations, en fonction des conditions générales d'hygiène de l'abattoir, du matériel et des techniques utilisés et, en indiquent l'importance de ces étapes dans la qualité microbiologique du poulet de chair.

C'est ainsi que, dans l'abattoir étudié, il a été constaté que la flore totale est relativement peu nombreuse et que, sur le plan technique, on réalise l'éviscération pratiquement « à sec » ; par ailleurs les conditions générales d'hygiène y sont relativement bonnes.

La détermination des germes constituant la flore rencontrée met en évidence les faits suivants :

Les *Pseudomonas* et les levures sont, sinon absents, du moins très rares sur les sujets vivants et aux premiers stades de la préparation des poulets ; la flore dominante est alors constituée par des *Achromobacter* puis des *Corynebacterium*, les manipulations et, en particulier, l'éviscération sont d'une importance capitale : c'est à ce moment que l'on voit se développer les germes qui constituent l'essentiel de la flore psychrotrophe responsable des altérations ultérieures : les *Pseudomonas*.

Cependant, malgré le nombre important des souches identifiées et bien que les résultats obtenus donnent une idée assez précise de l'incidence des différents microorganismes rencontrés aux divers postes étudiés, il n'en reste pas moins que cette distribution puisse ne pas être exactement la même dans un autre abattoir ni même dans cet abattoir considéré à un autre moment.

Les facteurs de variation susceptibles d'influencer la constitution de la flore sont en effet très nombreux : nature et origine des bandes de volailles, saison, état de propreté de l'abattoir, etc.

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour évaluer l'importance de ces facteurs et vérifier, en particulier, si le développement des *Pseudomonas* commence toujours après l'éviscération.

Et dans un deuxième temps concernant l'étudié sur l'influence de la contamination du lait de fabrication par des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle.

Nous avons constaté une très forte augmentation des teneurs en méthyl cétones et en alcools secondaires. Plus une dégradation des protéines qui semble s'arrêter à un stade intermédiaire comme en témoigne l'amertume observée.

Et enfin dans l'étude sur la thermorésistance des bactéries psychrotrophes du lait cru et leur protéinase conduit à un traitement thermique modéré et suffisant pour éviter la production des protéinases thermorésistantes pendant le stockage du lait cru sous des conditions réfrigérées. Un procès de thermisation (65°C/10s) empêche la croissance des bactéries psychrotrophes, ce qui est au point de vue énergétique plus favorable qu'une pasteurisation (72-74°C/15s).

Et que les paramètres cinétiques d'inactivation laissent supposer que la destruction thermique des protéinases thermorésistantes exige des traitements thermiques qui nuiraient d'une manière inadmissible à la qualité du lait.

La méthode, basée sur un substrat tripeptidique, se révèle comme sensible et rapide pour une détermination précise de l'activité des solutions d'enzymes protéolytiques d'origine bactérienne.

En résumé nous pouvons conclure qu'utilisation de la réfrigération pour assurer la conservation des denrées alimentaires préserve les qualités organoleptiques des produits mais favorise l'émergence de flores microbiennes psychrotrophes, qui colonisent un substrat laissé disponible du fait de l'inhibition des autres flores.

Les bactéries psychrotrophes sont les agents de nombreux types d'altérations des denrées réfrigérées. Certaines, en particulier *Listeria monocytogenes* constituent des menaces pour la santé publique.

Ce constat ne remet pas fondamentalement en cause le recours à la réfrigération, mais motive une utilisation raisonnée de ce procédé. Une parfaite maîtrise de la chaîne du froid, garantissant une température inférieure à +2°C, est indispensable et constitue une étape majeure pour la mise en place de plans d'assurance de la sécurité dans les entreprises agroalimentaires. Une attitude responsable est aussi nécessaire de la part de tous les intervenants des filières de production et de distribution, afin que la durée de vie des produits alimentaires soit fixée sur la base d'études scientifiques sérieuses plutôt qu'en fonction d'arguments commerciaux.

Références bibliographiques

III.5 Bibliographie :

1. **Anonyme 1 (2007)**, Cahier de Nutrition et de diététique, pp 124-130. 12
2. **Mottar J. (1984)**, thermorésistantes bactéries psychrotrophes du lait cru et de leurs protéinases. *Le lait* 64, 356-367
3. Cécille Labelle C, Meurier C, Marie Thérèse., (1972), La flore psychrotrophe des carcasses de volailles Evolution aux différents postes d'une chaîne d'abattage. *Annales de recherches vétérinaires, INRA. Editions*, 3 (3), pp.421-434.
4. **Dumont J.P, Delepau G, Miguot B, Adda. J (1977)** Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâtes molle. *Le lait*, (569-570), pp 619-630.
5. Commère B. (1998), Sécurité alimentaire et normes. Problématique de la chaîne du froid. *Rev. Gén. Froid*, 988, 23-27
6. **Anonyme**, (1995), réglementant l'hygiène des aliments remis directement au consommateur. 8219-8223
7. **Lahellef et Meurier C. (1970)**, **contamination bactérienne et conservation des viandes** *inform. Stat, avic Ploufragan (côté du nord)* 10, (3), 82-108.
8. **Rosset R.** (1995), Conservation de la viande : Recours impératif au froid. Problèmes posés et solutions. *Rev. Gén. Froid*,
9. **Vallet J.L. (1997)**, La froide « clé de voûte » de l'industrie de transformation du poisson. *Rev. Gén. Froid*, 978, 15-19
10. **Willemot C.** (2001) Incidence physiologique de la conservation au froid. In : « Technologie des légumes » (Tirilly Y., Bourgeois C.M.), *Tec Doc Lavoisier*, 283-296
11. **Gac A.** (2000), Les perspectives de développement de la logistique frigorifique. *Comptes rendus Acad. Agriculture France*, 86 5, 137-154
12. **Billard F.** (1996), La logistique du froid dans le commerce de détail. *Rev. Gén. Froid*, 967, 38-44
13. **CREDOC et AFSSA**, (2000), Ministère de l'Agriculture et de la Pêche « Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires » *Tec Doc Lavoisier*,
14. **Rosset R. (2001)**, Croissance microbienne et Froid. *Bull. Acad. Nat. Med.*, 185, 2, 287-299
15. Anonyme. (2001), Rapport GIRA-SIC
16. **Mayer Hofer et al. 1981.** *Le lait*, conservation UHT. (25), 78-82.
17. **Amrouche A.** (2010) la réfrigération des produits agricoles et alimentaires, Génie alimentaire.

18. **Maas Van Brekel B., et al., (2005)**, La conservation du poisson et de la viande. Fondation Agromisa, Wageningen .p10
19. **Kouffmann et al., (1954)**, the destruction rate of psychrophilic bacteria. Journal of Applied bacteriology, 50, 289-303.
20. **Pierre O. et Veit P. (1996)**, Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 45, p195-197
21. **Djkaoua A., Bouhafs K., Kouader S., (2007)**, contrôle bactériologiques des viandes rouges congelées distribués dans la région de Ghardaïa, Mém. Microbiologie D.E.S. Ouargla.
22. **ANONYME (1978)**, Microorganisms in foods (1) ; Their significance and methods of enumeration, 434 pages, University of Toronto Press Editeur, Toronto,
23. **ANONYME (1986)**. Bergey's manual of systematic bacteriology ; volume 1, 964 pages, Williams and Wilkins Editeur, Baltimore,
24. **BORNERT G.(1996)**, Viandes fraîches de boucherie : détermination de la date limite de consommation. Bull. Soc. Vét. Prat. De France, p80, 2, 69-81.
25. **BOURGEOIS C. et al.,. (1996)**, Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments, 672 pages, Lavoisier Editeur, Paris
26. **CATTEAU M. (1999)**, Pathogènes rencontrés lors de la conservation par le froid. In : La microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés, 333 pages, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg.
27. **Amat-Rose J.M, (1997)**, Dynamiques porteuses de risque en Europe, lettre de l'infectiologue, 12, 326-327.
28. **DE VALK H., et al., (2000)**, Bouffée épidémique de listériose liée à la consommation de rillettes, France, octobre-décembre. Synthèse des données disponibles au 12/01/2000. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, p4, 15-17.
29. **DRUESNE A. (1996)**, Le stress bactérien ; conséquences sur l'efficacité des traitements thermiques. 1ère partie système d'adaptation des microorganismes. Bull. Liaison CTSCCV6, 1, 3-6.
30. **DRUESNE A. (1996)**, Le stress bactérien ; conséquences sur l'efficacité des traitements thermiques. 2ème partie : le stress bactérien. Bull. Liaison CTSCCV, 6, 2, 71-81.
31. **FOURNAUD J. (1982)**, Type de germes rencontrés aux différents stades de la filière. In : Hygiène et technologie de la viande fraîche, 353 pages, Centre national de la recherche scientifique Editeur, Paris,

32. **GARRY P.** et **LE GUERN L.** (1999), Les bactéries lactiques. Bull. Liaison CTSCCV, 9, 6, 423-429.
33. **GILL C.** et **NEWTON K.** (1977), The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperature. J. Appl. Bacteriol, 43, 189-195.
34. **GOUNOT A.-M.** (1991), Bacterial life at low temperature ; physiological aspects and biotechnological implications. J. Applied Bacteriol, 71, 386-397.
35. **LARPENT J.-P.** (1995), Listeria, Lavoisier Editeur, Paris, 140 p
36. **LECLERC H.** et **MOSSEL D.A.A** (1989), Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments, 529 pages, Doin Editeur, Paris.
37. **MAHIEU H.** (2000), Modifications du lait après récolte. In : Les laits, de la mamelle à la laiterie, 397 pages, Lavoisier Editeur, Paris, 1984. Revue Méd. Vét, 151, 11, 1003-1010.
38. **PIERRE O.** et **VEIT P.** (1996), Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 45, 195-197.
39. **ROBERTS T.A.** (1999), Predictive microbiology applied to chilled food preservation. In : La microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés, 333 pages, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg,
40. **ROCOURT J.** et **JACQUET C.** (1994), Epidémiologie des infections humaines à *Listeria monocytogenes* en certitudes et interrogations. Annales de l'Institut Pasteur 5, 3, 168-174.
41. **ROSSET R.** (1974), Problèmes microbiologiques concernant le traitement des viandes par réfrigération et congélation. Rev. Gén. Froid, 65, 10, 1075-1082.
42. **ROZIER F.** (1995), H.A.C.C.P., de la théorie à quelques contraintes, 80 pages, La Cuisine Collective Editeur, Paris.
43. **SALVAT G. et al.,** (1995), Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries ; the lessons of a listeriosis out break in France. International Microbiology, 25, 75-81.
44. **SALVAT G. et ERMEL G** (1997), Epidémiologie de *Listeria monocytogenes* dans la filière porcine. Viandes Prod. Carnés, 18, 6, 264-268.
45. **AYRES J. C.,**(1960). The Relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. J. appl. Bacteriol. 23, 47x-86.
46. **BARNES E. M.,** (1959). The sources of the different psychrophilic spoilage organisms on chilled eviscerated poultry. Proc. 10th intention. Congele. Refriger., 3, 97-100.

47. **BARNES E. M., (1960).** Bacteriological problems in broiler preparation and Storage. R. Soc. Health J. 8, 3, 145-148.
48. **BARNES E. M., THORNLEY M. J., (1966).** The spoilage flora of eviscerated chickens stored at different temperatures. J. Food Technol., 1, 113 -9.
49. **BARNES E. M., IMPEY C. S., (1968).** Psychrophilic spoilage of poultry. J. appl. Bacteriol., 31, 97-107.
50. **BARNES E. M., SHRIMPSON D. H., (1968).** The effect of processing and marketing procedures on the bacteriological condition and shelf life of eviscerated turkeys. Brit. Poultry Sci., 9, 243-25x. 1.
51. **Buttiaux R., BERENS H., TACQUET A., (1969).** Manuel de Techniques Bactériologiques. 707 p., 3^{ème} édition, Flammarion, Paris.
52. **CATSARAS M., GREBOT D., (1969).** Étude complémentaire sur les bactéries psychrotrophes des viandes. Ann. insti. Pasteur Lille, 1969, 20, 231 -38.
53. **CLARK P.S., LENTZ C. P., (1969),** Microbiological studies in poultry processing plants in Canada. Canad. G Instit. Food Techno. J., 2, 33-36.
54. **GUNDERSON M. F., Me FADDEN H. W., KVLE T. S., (1954).** The bacteriology of commercial poultry processing. Burgess Publishing Co., Minneapolis, États-Unis.
55. **AHELLEC C., MEURIER C., (1970) a.** Contaminations bactériennes et conservation des viandes. Budl. L'Inform. Stat. Avic Ploufragan (Côtes-du-Nord), 10, 3, 82-106.
56. **FELLEC C., MEURIER C., (1970)b.** Variation dans l'importance quantitative des contaminations bactériennes des carcasses de volailles. Bull. Inform. Stat. Avic Ploufragan. (Côtes-du-Nord), 10, 4, xx8-x 35.
57. **SCHEFFERLE. H. E., (1966).** *Coryneform* bacteria in poultry deep litter. J. appl. Bacteriol., 29, 147 -60.
58. **SHEWAN J. M etHod Gkiss W., (1960).** A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram (negative) bacteria with special reference to the *Pseudomonadaceae*. J. appl. Bacteriol., 23, 379-390.
59. **SHEWAN J. M., HOBBS G., HODGKISS W., (1960) b.** The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of W bacteria in the spoilage of white fish. J. appl. Bacteriol., 23, 463-8.
60. **ALKER H., AYRES J. C., (1956).** Incidence and kinds of microorganisms associated with commercially dressed poultry. Appl. Microbiol., 4, 34.
61. **DUMONT J.P., ROGER. G et ADDA J. (1974).** - Le Lait, 54, 531-532.
62. **FEUILLET M., GUENNEC S. L et OLSSONA. (1976).** Le Lait, 56, 521-536.

63. **Hogono A. ELLIOT J.A. etMc GUGAN W.A. (1974).** J. Dairy Sei., 57 (5), 535-539.
64. **KJURU K et al., (1971).** Milchwissenschaft, 26 (3), 138-141.
65. **LAUWERYS R. (1969).** Anal. Biochimie., 32, 331.
66. **LAW B.A., SHARPE M.L. et CHAPMAN H.R (1976).** - J. Dairy Res., 43 (3), 459-468.
67. **QVIST A. H. and VON SYDOW.E. (1974).** J. Agr. Food Chem., 22, 1077.
68. **SCHWARTZ D.P.etKEENEY. M (1963).** Anal. Chem., 35, 219.
69. **SCHWARTZ D.P etPARKS (O. W.) (1963).** J. Dairy Sci., 46, 989.
70. **VON SYDOW E., et al., (1970).** - Lebens. Wiss. u. Techno., 3, 11.

Annexes

Annexe 1 :

PCA (Plate Count Agar) :

Tryptone	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose.....	1g
Agar.....	15g
Eau distillée	1L

PH= 7,2 ±0,2

• **King A:**

Peptone A	20g
Glycérol.....	10g
Chlorure de magnésium.....	1,4g
Sulfate de potassium.....	10g
Agar.....	12g
Eau distillée	1L

PH= 7,2 ±0,2

• **King B :**

Peptone de viande.....	10g
Peptone de caséine.....	10g
Phosphate dipotasique	1,5g
Sulfate de magnésium	1,5g
Agar.....	15g
Eau distillée	1L

PH= 7,2 ±0,2

Annexe 2 :














• **Coloration de Gram :**

- ✓ Une goutte de la suspension bactérienne a été étalée en couche

mince et régulière sur la lame. Après fixation du frottis à la chaleur.

- ✓ Recouvrir le frottis d'une solution de violet de Gentiane, laisser agir 1 minute.
- ✓ Verser le lugol, laisser agir 1 à 2 minute.
- ✓ Laver à l'eau distillée.
- ✓ Décolorer avec l'alcool acétone pendant 30 secondes.
- ✓ Laver à l'eau distillée.
- ✓ Recolorer par la fuchsine pendant 2 à 3 minute.
- ✓ Laver à l'eau distillée.
- ✓ Sécher entre deux feuilles de papier Joseph.
- ✓ Observer à immersion×100.

BIEN CONSERVER SES LÉGUMES - PARTIE I/II

	Où	Combien de temps?	Comment?
 Asperges	Au réfrigérateur	4 jours	La tige dans l'eau Légèrement entourées de cellophane
 Betteraves	Sur le comptoir jusqu'à maturité Au réfrigérateur une fois mûres	2 semaines	Dans un sac plastique
 Poivrons	Au réfrigérateur	1 semaine	Dans un sac plastique
 Brocolis	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	5 jours	Emballés dans du cellophane
 Choux	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	2 semaines	Emballés dans du cellophane
 Carottes	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	3 semaines	Dans un sac plastique
 Chou-fleur	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	5 jours	Emballé dans du cellophane
 Céleris	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	2 semaines	Emballés dans du papier aluminium
 Concombres	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	1 semaine	Emballés dans du cellophane
 Légumes feuillus	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	1 semaine	Dans un sac plastique, avec du sopalin
 Ail	Dans un garde-manger à l'abri de la lumière	2 mois	Déconditionné Entier
 Gingembre	Au réfrigérateur	1 mois	Déconditionné
 Tranches de gingembre	Dans le compartiment froid du réfrigérateur	1 à 2 semaines	Dans un sac plastique, avec du sopalin