



THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par HO Thi Nguyet Thu

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Sciences des Aliments et Nutrition

**ÉTUDE DE LA FLORE LACTIQUE DU NEM CHUA, PRODUIT CARNÉ
FERMENTÉ CRU TRADITIONNEL DU SUD VIETNAM ET MAÎTRISE DU
PROCESSUS DE FERMENTATION PAR AJOUT DE SOUCHES LACTIQUES
SÉLECTIONNÉES SPÉCIFIQUES DU PRODUIT**

Soutenu le 17 Décembre 2008

Devant la commission d'examen formée de :

M. Alain DESCHAMPS, Professeur, Université Bordeaux 1
M. NGUYEN Ngoc Tuan, Professeur, Université Nông Lâm, Vietnam
M. Claude CHEVRIER, Professeur, Université de Tours
M. LUU Duan, Professeur, Université de Technologie de Saigon, Vietnam
M. Roland CAUBET, Maître de conférences, ISTAB, Université Bordeaux 1
M. NGUYEN Ngoc Hai, Professeur, Université Nông Lâm, Vietnam
Mme Maria URDACI, Professeur, ENTA de Bordeaux

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invitée

N° d'ordre : 3738

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par **HO Thi Nguyet Thu**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Sciences des Aliments et Nutrition

**ÉTUDE DE LA FLORE LACTIQUE DU NEM CHUA, PRODUIT CARNÉ
FERMENTÉ CRU TRADITIONNEL DU SUD VIETNAM ET MAÎTRISE DU
PROCESSUS DE FERMENTATION PAR AJOUT DE SOUCHES LACTIQUES
SÉLECTIONNÉES SPÉCIFIQUES DU PRODUIT**

Soutenue le 17 Décembre 2008

Après avis de :

M. Claude CHEVRIER, Professeur, Université de Tours
M. LUU Duan, Professeur, Université de Technologie de Saigon, Vietnam

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Alain DESCHAMPS, Professeur, Université Bordeaux 1
M. NGUYEN Ngoc Tuan, Professeur, Université Nông Lâm, Vietnam
M. Claude CHEVRIER, Professeur, Université de Tours
M. LUU Duan, Professeur Université de Technologie de Saigon, Vietnam
M. Roland CAUBET, Maître de conférences, ISTAB, Université Bordeaux 1
M. NGUYEN Ngoc Hai, Professeur, Université Nông Lâm, Vietnam
Mme Maria URDACI, Professeur, ENITA de Bordeaux

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invitée

ABREVIATIONS

✓ Nomes de Genres bactériens

Ae. : *Aerococcus*
Ba. : *Bacillus*
Ca. : *Carnobacterium*
Cl. : *Clostridium*
E. : *Escherichia*
En. : *Enterococcus*.
La. : *Lactococcus*
Lb. : *Lactobacillus*
Le. : *Leuconostoc*
Li. : *Listeria*
Oe. : *Oenococcus*
Pe. : *Pediococcus*
Ps. : *Pseudomonas*
Sa. : *Salmonella*
Sp. : *Streptococcus*
St. : *Staphylococcus*
Te. : *Tetragenococcus*
Va. : *Vagococcus*
We. : *Weissella*

✓ Unités de mesures

°C : degré Celsius
cm, µm, nm : centimètre, micromètre, nanomètre
g, mg, pg : gramme, milligramme, microgramme
h : heure
kGy : kilogray
L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre
M, mM : mole, millimole
min : minutes
pb : paire de base
s : seconde
p/v : poids par volume
V : volt
v/v : volume par volume

✓ Sigles

ADN : acide désoxyribonucléique
AFNOR : Association française de Normalisation
AMDE ou AMDEC : analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité
ARNr : acide ribonucléique ribosomique
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : adénosine triphosphate
 a_w : activité de l'eau
BET : bromure d'éthidium
BL : bactéries lactiques
CGC : coques Gram positif, à catalase positive
CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CNRZ : Centre National de la Recherche Zootechnique
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DLC : Date Limite Consommation
EDTA: acide diamine-éthylène-tétra-acétique
EPS : Exopolysaccharides
HACCP : Hazard analysis critical control point
HPLC : High-performance liquid chromatography
HR : humidité relative
IAA : Industrie agro-alimentaire
ISO : International Organization for Standardization
GDP : Gross Domestic Products
LMBA : Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie appliquées
LSD : Least Significant Difference
MRD : Maximum Recovery Diluent
MRS : de Man, Rogosa et Sharpe
MSG: Monosodium glutamate
NCIMB : National Center of Industrial & Marine Bacteria
PCR: Polymerisation chain reaction
PLSR : Partial Least Squares Regression
PME : petites et moyennes entreprises
PRPs : Pre Requisites Programs
PU : Primer universel
QDA : Quantitative Descriptive Analyse
RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA
REP-PCR : Repetitive element PCR
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
rpm : round per minute
SDS : dodécyl-sulfate de sodium
SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
ssp. : sous espèce
TAE : Tris-Acétate-EDTA
TBA : Thiobarbiturique
TBE : Tri-Borate-EDTA
TCVN : Tiêu chuân Việt Nam (Norme vietnamienne)
TE : Tris-EDTA
TEMED: tétra-méthyl-éthylènediamine
TS : trypticase soja
TSA : trypticase soja agar
UV : ultra violet
U : unité
UFC : unité formant colonie

Publications :

Thi Nguyet Thu HO, Nguyen Ngoc TUAN, Alain DESCHAMPS, Roland CAUBET

Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the 'Nem Chua' –fermented meat product of Vietnam.

International Workshop on Food Safety and Processing Technology, Ho Chi Minh City, Nov. 2007, Proceedings pages 134-142

Thi Nguyet Thu HO, Nguyen Ngoc TUAN, Alain DESCHAMPS, Abdessatar HADJ SASSI, Maria URDACI, Roland CAUBET

The impact of *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus* on the sensorial quality of "Nem chua" – a Vietnamese fermented meat product.

International Food Research Journal (ISSN 1985-4668), Manuscript IFRJ-2008-128, accepté pour publication (issue 16, janvier 2009)

En cours de rédaction :

Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria involved in the fermentation of Nem Chua, a fermented meat product of Vietnam, à soumettre à « *Food Microbiology* » (Elsevier)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PARTIE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE 1. FLORE MICROBIENNE DE LA VIANDE ET DES PRODUITS CARNÉS	5
1.1. Microflore de la viande	5
1.1.1. Flore endogène et contaminations.....	5
1.1.2. Evolution de la microflore et dégradation de la viande.....	9
1.1.3. Moyens de réduction de la charge microbienne de la viande.....	11
1.2. Microflore des produits carnés	12
1.2.1. Flore microbienne de la viande séchée.....	12
1.2.2. Flore microbienne de la viande salée	13
1.2.3. Flore microbienne des produits carnés fermentées	14
1.3. Maîtrise de la qualité microbiologique en industrie agro - alimentaire	16
CHAPITRE 2. BACTERIES LACTIQUES	18
2.1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques	18
2.2. Classification	20
2.2.1. Classification au niveau du genre	21
2.2.2. Identification et classification au niveau de l'espèce	24
2.2.2.1. Streptocoques et autres coques lactiques.....	25
2.2.2.2. <i>Aerococcus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	28
2.2.2.3. <i>Leuconostoc</i> et <i>Weissella</i>	30
2.2.2.4. Lactobacilles et autres bactéries lactiques	32
2.3. Ferments lactiques et utilisations en agro-alimentaire	35
2.3.1. Généralités	35
2.3.2. Fonctions des ferments lactiques	37
2.3.2.1. Activité acidifiante	38
2.3.2.2. Activité protéolytique.....	39
2.3.2.3. Activité lipolytique et formation de substances aromatiques	40
2.3.2.4. Production des substances inhibitrices	40
2.3.2.5. Formation des exopolysaccharides.....	41
CHAPITRE 3. EVALUATION SENSORIELLE DES PRODUITS ALIMENTAIRES.	43
3.1. Généralités	43

3.2. Epreuves d'évaluation sensorielle.....	44
3.2.1. Méthode de notation du Vietnam (TCVN 3215 – 79)	45
3.2.2. Epreuves discriminatives.....	46
3.2.3. Epreuve de classement par rangs	47
3.2.4. Epreuves descriptives (ou méthode de profil sensoriel).....	47
3.2.5. Epreuves hédoniques (test de consommateurs)	49
PARTIE II - MATERIELS ET METHODES	51
1. MATERIELS	51
1.1. Milieux de culture et réactifs pour le dénombrement et l'identification de la flore lactique du Nem chua	51
1.1.1. Pour le dénombrement.....	51
1.1.1.1. MRS (Man, Rogosa et Sharpe)	51
1.1.1.2. MRD (Maximum Recovery Diluant)	52
1.1.2. Milieux de culture et réactifs pour les tests d'orientation	52
1.1.3. Amorces et mélanges réactionnels utilisés pour les techniques biomoléculaires.....	53
1.1.3.1. Pour l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD).....	53
1.1.3.2. Pour l'amplification <i>in vitro</i> de l'ADN 16S (PCR).....	53
1.1.3.3. Pour la PCR – DGGE (Electrophorèse sur le gel en gradient dénaturant).....	54
1.1.4. Composition du gel d'acrylamide pour la PCR – DGGE.....	54
1.2. Nem chua : produits finis ou en cours de fabrication	55
1.3. Pâte de viande et fabrication des Nem chua expérimentaux	56
2. METHODES	56
2.1. Mesure des caractéristiques physicochimiques	56
2.1.1. pH	56
2.1.2. a_w	56
2.1.3. Teneur en matières sèches	57
2.1.4. Quantité des acides organiques produits au cours de la fermentation.....	57
2.2. Analyses microbiologiques classiques.....	57
2.2.1. Echantillonnage.....	57
2.2.2. Préparation des échantillons et dénombrement de leur flore lactique.....	58
2.2.3. Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques.....	58
2.2.4. Identification des bactéries lactiques par galerie API 50 CHL.....	60
2.2.5. Recherche des substances inhibitrices par la méthode des puits	60
2.3. Techniques biomoléculaires	61
2.3.1. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD).....	61

2.3.2. Amplification in vitro de l'ADN 16S (PCR)	62
2.3.3. Technique PCR – DGGE.....	62
2.3.3.1. Préparation des échantillons	62
2.3.3.2. Extraction des ADN du Nem chua et amplification des ADN des bactéries	62
2.3.3.3. Electrophorèse verticale en gel d'acrylamide et gradient dénaturant	63
2.3.3.4. Séquençage des bandes de DGGE	63
2.4. Standardisation du nombre des starters lactiques utilisés	63
2.4.1. Détermination de la relation entre l'absorbance et la concentration en bactéries starters.....	64
2.4.2. Dosage des suspensions starters servant à ensemercer la pâte de viande.....	64
2.5. Plan d'expériences de l'ensemencement des starters lactiques	65
2.5.1. Inoculation séparément avec chaque souche starter.....	65
2.5.2. Inoculation avec la combinaison des souches prises deux à deux	65
2.5.3. Choix de la dose optimale d'ensemencement.....	66
2.5.4. Choix de la dose et la proportion pour les 2 souches starters retenues	66
2.5.5. Détermination de la meilleure formulation de starter	67
2.6. Evaluation sensorielle	67
2.6.1. Test de classement par rangs	67
2.6.2. Test de description des attributs sensoriels des Nem chua.....	68
2.7. Expressions des résultats	69
PARTIE III - RESULTATS ET DISCUSSIONS	70
CHAPITRE 1 - ETUDE DES PROCEDES DE FABRICATION ET DES CARACTÉRISTIQUES DU NEM CHUA AU SUD DU VIETNAM	70
1.1. Processus de fabrication des Nem chua	70
1.1.1. Généralités	70
1.1.2. Procédé de fabrication	74
1.1.2.1. Matières premières – Choix, rôle et traitements préliminaires	74
1.1.2.2. Transformation de la pâte de viande	84
1.1.2.3. Mise en forme et emballage.....	85
1.1.2.4. Fermentation	87
1.2. Maîtrise et contrôle de la qualité des produits finis.....	89
CHAPITRE 2 – FLORE LACTIQUE DU NEM CHUA.....	93
2.1. pH de la viande et de la pâte de viande avant fermentation	93
2.2. Evolution du pH des Nem chua au cours de fermentation.....	95
2.3. Evolution de la flore lactique pendant la fermentation du Nem chua.....	96

2.4. Identification des bactéries lactiques des Nem chua.....	100
2.4.1. Evolution des différentes classes de colonies selon leur aspect morphologique.....	101
2.4.2. Identification phénotypiques par galerie API 50 CHL.....	104
2.4.3. Identification par technique RAPD-PCR et séquençage des ARNr 16S.....	107
CHAPITRE 3 – UTILISATION DES BACTERIES LACTIQUES ISOLÉES EN TANT QUE STARTER.....	112
3.1. Effet individuel de chaque souche	112
3.1.1. Evolution du pH des Nem chua au cours de la fermentation	112
3.1.2. Qualité sensorielle des produits finis	113
3.2. Effets des combinaisons deux à deux des souches lactiques sélectionnées	115
3.2.1. Evolution du pH des Nem chua au cours de la fermentation	115
3.2.2. Qualité sensorielle des produits finis	116
3.3. Caractérisation des souches choisies.....	118
3.4. Optimisation de la dose à inoculer en BE et PE sélectionnées.....	120
3.4.1. Evolution du pH des Nem chua au cours de la fermentation	120
3.4.2. Evaluation sensorielle.....	121
3.4.2.1. Choix de la dose optimale d'ensemencement de chacune des deux souches	126
3.4.2.2. Choix de combinaison optimale de <i>Lb. brevis</i> et <i>Pe. pentosaceus</i>	127
3.4.2.3. Détermination du meilleur starter pour la fabrication du Nem chua.....	129
3.4.2.4. Intensité des attributs sensoriels des Nem chua fabriqués avec ou sans ajout	130
3.4.3. Evolution des souches lactiques au cours du processus de fermentation.....	134
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	144
ANNEXES.....	157
Annexe 1 - Situation géographique des provinces	157
Annexe 2 - Marqueur de taille des fragments d'ADN.....	161
Annexe 3 - Equations de corrélation.....	162
Annexe 4 - Modèle de présentation des Nem chua	167
Annexe 5 - Fiche de dégustation	170
Annexe 6 - Densité optique des souches.....	171
Annexe 7 - Fiche de description des attributs sensoriels	172
Annexe 8 - Note des attributs sensoriels.....	173
Annexe 9 - Analyses statistiques	176
Annexe 10 - Principal component analysis	181
Annexe 11 - PLS coefficient plot for preference.....	182

LISTE DES FIGURES

Figure ^(I) 1– Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Bacillus</i>	25
Figure ^(II) 1 – Plan d'échantillonnage des prélèvements	59
Figure ^(III) 1 – Evolution du nombre d'ouvriers et du rendement de la fabrication des Nem chua à Lai Vung de 1975 à 2005	72
Figure ^(III) 2 – Procédé commun de la fabrication des Nem chua.....	73
Figure ^(III) 3 – Maigre de porc.....	77
Figure ^(III) 4– Couenne de porc	77
Figure ^(III) 5– Condiments	77
Figure ^(III) 6– Ail	77
Figure ^(III) 7 – Poivre noir	77
Figure ^(III) 8 – Préparation de pâte de viande.....	77
Figure ^(III) 9 – Préparation de la viande maigre	78
Figure ^(III) 10 – Hachage de la viande	78
Figure ^(III) 11 – Ajout des ingrédients	78
Figure ^(III) 12 – Pilage de la viande	78
Figure ^(III) 13 – Cuisson de la couenne.....	79
Figure ^(III) 14 – Epilage de la couenne	79
Figure ^(III) 15 – Couenne cuite	79
Figure ^(III) 16 – Appareil de découpe de la	79
Figure ^(III) 17 – Découpe de la couenne	79
Figure ^(III) 18 – Filaments de la couenne	79
Figure ^(III) 19 – Mélange à petit rendement	80
Figure ^(III) 20 – Mélange à moyen rendement.....	80
Figure ^(III) 21 – Ajout des filaments de couenne.....	80
Figure ^(III) 22 – Ajout du poivre noir.....	80
Figure ^(III) 23 – Mise en forme à la main.....	80
Figure ^(III) 24 – Formage mécanique	80
Figure ^(III) 25 – Feuilles "Chùm ruột"	81

Figure _(III) 26 – Feuilles de bananier	81
Figure _(III) 27 – 1 ^{er} Emballage de feuille de "Chùm ruột"	81
Figure _(III) 28 – Mise du film plastique.....	81
Figure _(III) 29 – Emballage par des couches de feuilles de bananier	81
Figure _(III) 30 – Fermentation des Nem chua	82
Figure _(III) 31 – Nem chua.....	82
Figure _(III) 32 – Vente des Nem chua	82
Figure _(III) 33 – Profil RAPD de différentes souches PL _X de <i>Lb. plantarum</i>	110
Figure _(III) 34 – Profil RAPD de <i>Lb. brevis</i>	111
Figure _(III) 35 – Intensité des attributs sensoriels des Nem chua inoculés <i>Lb. brevis</i> et/ou <i>Pe. pentosaceus</i>	131
Figure _(III) 36 – Corrélation entre les attributs sensoriels des Nem chua témoins et ceux fabriqués en ajoutant les <i>Lb. brevis</i> et/ou les <i>Pe. pentosaceus</i>	133
Figure _(III) 37 – Corrélation entre la préférence des consommateurs vietnamiens et les attributs sensoriels des Nem chua étudiés.....	133
Figure _(III) 38 – Evolution de la flore lactique des Nem chua témoin au cours de la fermentation	135
Figure _(III) 39 – Evolution de la microflore lactique au cours de la fermentation des Nem chua inoculés les <i>Lb. brevis</i> (BE) à trois niveaux de dose examinés.....	136
Figure _(III) 40 – Evolution de la microflore lactique au cours de la fermentation des Nem chua inoculés les <i>Pe. pentosaceus</i> à trois niveaux de dose examinés.....	136
Figure _(III) 41 – Evolution de la flore lactique durant la fermentation des Nem chua inoculés les <i>Lb. brevis</i> et <i>Pe. pentosaceus</i> à trois proportions différentes	138
Figure _(a) 1 – Carte administrative du Vietnam et situation géographique	160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau _(I) I – Genres bactériens les plus fréquents dans la viande.....	7
Tableau _(I) II – Genres de moisissures et de levures les plus présentes dans les viandes	8
Tableau _(I) III – Quelques caractéristiques de bactéries lactiques	23
Tableau _(I) IV – Echelle de classement des produits alimentaires selon leur qualité sensorielle (Norme TCVN 3215 – 79)	46
Tableau _(II) I – Composition de 20 mL de gel polyacrylamide au gradient dénaturant de 30% à 50 %	
Tableau _(II) II - Plan factoriel à deux niveaux.....	66
Tableau _(III) I - Evolution du chiffre d'affaires des grands ateliers à Lai Vung.....	72
Tableau _(III) II - Recette de fabrication des Nem chua du Sud Vietnam	76
Tableau _(III) III – Nombre total et caractéristiques de différents types de colonies lactiques existant sur les feuilles de "Chum ruôt"	88
Tableau _(III) IV – Espèces lactiques identifiées sur les feuilles de "Chùm ruôt"	89
Tableau _(III) V– Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques des Nem chua	91
Tableau _(III) VI – Qualité microbiologique des Nem chua des ateliers étudiés	92
Tableau _(III) VII – pH de la viande fraîche et des Nem chua au cours de la fermentation	94
Tableau _(III) VIII – Concentrations en bactéries lactiques de la viande fraîche.....	97
Tableau _(III) IX – Caractéristiques biochimiques et microbiologiques des colonies lactiques du Nem chua	102
Tableau _(III) X – Pourcentages des types de colonies lactiques au cours de la fermentation des Nem chua (% de la population).....	103
Tableau _(III) XI – Bactéries lactiques identifiées au cours de la fermentation des Nem chua (identification en utilisant les galeries API 50 CHL)	106
Tableau _(III) XII – Correspondance entre les identifications biochimiques et moléculaires....	109
Tableau _(III) XIII – pH des Nem chua témoins et ensemencés avec les différentes bactéries lactiques	113
Tableau _(III) XIV – Rangs et notes des Nem chua inoculés par chacune de cinq souches lactiques	114
Tableau _(III) XV – pH des Nem chua témoins et essais inoculés avec des combinaisons deux à deux des souches lactiques.....	116
Tableau _(III) XVI – Rangs et notes des Nem chua inoculés avec des combinaisons deux à deux des souches lactiques.....	117

Tableau ^(III) XVII – Séquence partielle du gène 16S ARN ribosomique de la souche PE sélectionnée.....	119
Tableau ^(III) XVIII – pH des Nem chua inoculés avec les <i>Lb. brevis</i> et/ou <i>Pe. pentosaceus</i> à différentes proportions.....	122
Tableau ^(III) XIX – Concentrations en acides organiques produits durant la fermentation des Nem chua inoculés avec <i>Lb. brevis</i> et/ou <i>Pe. pentosaceus</i>	124
Tableau ^(III) XX – Rangs et notes des Nem chua inoculés avec les <i>Lb. brevis</i> ou <i>Pe. pentosaceus</i> à différentes doses.....	127
Tableau ^(III) XXI - Rangs et notes des Nem chua inoculés avec les <i>Lb. brevis</i> et <i>Pe. pentosaceus</i> à différentes proportions dans leur combinaison.....	128
Tableau ^(III) XXII – Rangs et notes des Nem chuaensemencés avec des <i>Lb. brevis</i> et/ou <i>Pe. pentosaceus</i> aux concentrations optimales	129
Tableau ^(a) I – Variation de la température et pluviosité moyenne de HCMV.....	158

INTRODUCTION

Le Nem chua est un produit vietnamien fermenté à base de viande porcine. C'est un aliment populaire et apprécié des consommateurs du Vietnam par son goût aigre doux caractéristique, sa couleur rouge rosée attirante et sa texture ferme mais élastique à la fois. Plusieurs régions, telles Thu Duc (de Ho Chi Minh ville), Lai Vung (de la province Dong Thap), Ninh Hoa (de la province Khanh Hoa), Binh Dinh, Thanh Hoa, Hue..., sont réputées dans tout le pays pour la fabrication du Nem chua.

Avant la fermentation, la pâte de Nem chua est fabriquée à partir de maigre de porc finement pilé, mélangé avec de la couenne cuite coupée en filaments. La pâte ainsi obtenue est découpée en forme de "cubes" de 2 cm x 3 cm x 3 cm. Certains fabricants déposent à la surface du cube une tranche fine d'ail frais et/ou une tranche de piment pour la décoration. C'est une particularité de certains ateliers. Ces cubes sont ensuite entourés d'une feuille de *Phyllanthus acidus* (chùm ruột), d'*Erythrina orientalis* (érythrine) ou de *Psidium guajava* (goyavier). Viennent ensuite un film plastique de polyéthylène puis des couches de feuilles de bananier. Ces couches d'emballage successives peuvent amener des microorganismes en tant que flore initiale du Nem chua. Elles peuvent aussi créer des conditions de micro-aérobiose propices aux fermentations. Traditionnellement, la fermentation s'effectue à température ambiante (de 28 °C à 33 °C) durant trois à quatre jours. Les Nem chua sont instables à température ambiante et de ce fait, doivent être consommés rapidement. Le produit peut être consommé encore deux ou trois jours après. Ce délai est allongé à un mois si le produit est conservé au froid.

Cet aliment, même s'il est consommé couramment au Vietnam, est encore produit artisanalement dans une multitude d'ateliers de petite taille. Les transformateurs rencontrent souvent des problèmes technologiques et sanitaires. D'un point de vue organoleptique, la qualité des produits n'est pas constante à l'intérieur d'un même atelier, et *a fortiori* d'une unité de production à l'autre. Les accidents liés au processus peuvent être aussi la cause de proliférations des microorganismes indésirables, d'altération ou pathogènes (Truong *et al.*, 2004). Dans ces derniers cas, les microorganismes peuvent provenir de la matière première (mauvaises opérations d'éviscération des porcs par exemple) ou être introduits dans le processus par le non respect des règles d'hygiène. Il faut rappeler que nous sommes en présence de petites structures de production, employant donc la plupart du temps des employés non formés en ce qui concerne les règles d'hygiène. La probabilité d'introduire des pathogènes est donc forte. Cependant, le fait que le Nem chua est un produit ayant subi une fermentation lactique, les pathogènes sont donc souvent

inhibés voire même tués (Ammor *et al.*, 2006 ; Tyopponen *et al.*, 2003 ; Leroy *et al.*, 2002) grâce à divers mécanismes évoqués dans la synthèse bibliographique.

Peut-on utiliser des starters microbiens pour orienter le processus de fermentation et par conséquent bien maîtriser la qualité organoleptique et hygiénique de ce produit traditionnel, principalement dans une démarche industrielle ?

Dans les pays industrialisés, l'adjonction de starters microbiens dans la pâte de viande (fermentation orientée) s'est de plus en plus répandue au cours de ces dernières années. Pour beaucoup de produits, ceci a permis effectivement de mieux maîtriser le processus fermentaire et de prévenir les accidents liés à la croissance de microflore indésirables. De plus, la fermentation orientée assure une production plus rapide, plus standardisée et de meilleure qualité (Ammor *et al.*, 2007 ; Lücke, 2000 ; Hammes et Hertel, 1998). Les bactéries les plus fréquemment utilisées en tant que starters dans la fabrication des produits carnés fermentés sont les lactobacilles tels que les *Lactobacillus* : *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. pentosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. paracasei*, *Lb. farciminis*... (Cenci-Goga *et al.*, 2008 ; Gençcelep *et al.*, 2007 ; Latorre-Moratalla *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2006 ; Komprda *et al.*, 2004). Les *Pediococcus pentosaceus*, *Pe. acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus xylosum*, *St. carnosus*, sont également utilisés (Cenci-Goga *et al.*, 2008 ; Latorre-Moratalla *et al.*, 2007 ; Casaburi *et al.*, 2006 ; Muthukumarasamy *et al.*, 2006 ; Herranz *et al.*, 2004 ; Erkkilä *et al.*, 2001a ; Larrouture *et al.*, 2000). La plupart de ces starters carnés proviennent de la flore indigène du produit. Certaines études se sont également intéressées à l'application de bactéries issues d'autres sources telles que le lait (Cenci-Goga *et al.*, 2008), le « kim chi » (Lee *et al.*, 2006), ou même l'intestin (Sameshima *et al.*, 1998). D'après Talon (2007), le développement des ferments lactiques autochtones "intra-produit" est très prometteur en raison de leur haute adaptabilité aux conditions de fabrication.

Des études sur l'écologie microbienne des produits fermentés ont montré une grande diversification de la flore lactique dans le produit (Benito *et al.*, 2008 ; Drosinos *et al.*, 2007 ; Comi *et al.*, 2005 ; Rantsiou *et al.*, 2004). Cette diversification est due à la participation des bactéries provenant de divers éléments : les matières premières, les pratiques et l'environnement de fabrication (Lebert *et al.*, 2007 ; Urso *et al.*, 2006). Les souches prédominantes apparaissent comme de bonnes candidates en tant que starters car elles ont démontré, de fait, leur bonne adaptabilité.

Au Vietnam, à l'heure actuelle, l'incorporation de ferments lactiques dans la fabrication des produits fermentés n'est pas encore couramment utilisée. Certains

fabricants de Nem chua ont cependant testé des starters commerciaux destinés à la fabrication de produits carnés traditionnels industriels d'autres pays tels que le saucisson sec (France) ou artisanaux comme le Nham (Thaïlande). Il s'avère que le goût obtenu ne convenait pas aux consommateurs vietnamiens (communication personnelle). L'utilisation industrielle de starters composés des bactéries autochtones semble être une voie plus prometteuse non encore étudiée et testée dans le cas présent.

Jusqu'à ce jour, les recherches effectuées sur le Nem chua ont principalement porté sur les bactéries pathogènes et les aspects sanitaires (Hoang *et al.*, 2001 ; Do *et al.*, 2000). Ces études étaient axées sur la prolongation de la durée de conservation des produits finis par l'utilisation de membrane de chitosane (Nguyen *et al.*, 2005) ou de souches lactiques aux propriétés antibactériennes (Phan *et al.*, 2005). La flore lactique de Nem chua n'a pas été suffisamment étudiée. Seules quelques études sommaires ont été réalisées (Nguyen *et al.*, 2002).

Ce travail de thèse préfigure une industrialisation du procédé de fabrication du Nem chua. Il a donc consisté à rechercher des ferments lactiques autochtones adaptés, puis tester leur pertinence et leur efficacité pour garantir la qualité des produits obtenus tant au point de vue industriel (constance des productions) que du point de vue sensoriel (le plus adapté au goût vietnamien).

Notre manuscrit est divisé en trois parties. La première partie est consacrée à l'état des connaissances et comporte trois chapitres. Le premier chapitre présente la flore microbienne de la viande et celle des produits carnés. Les caractéristiques principales des bactéries lactiques intervenant dans l'agro-alimentaire et leurs utilisations en tant que starters lactiques sont détaillées dans le deuxième chapitre. Les méthodes d'évaluation sensorielle sont enfin développées dans le troisième chapitre.

La seconde partie du manuscrit présente les matériels et méthodes mis en œuvre dans le cadre de ce travail de thèse. Y sont détaillés les procédés de fabrication et les caractéristiques du Nem chua, le suivi de l'évolution de la flore lactique au cours de la fermentation du produit, les identifications par des techniques classiques puis par des méthodes moléculaires. L'évaluation sensorielle des produits obtenus, la conduite des essais et le traitement des données sont également présentés en fin de chapitre.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont ensuite exposés dans la troisième partie, en trois chapitres correspondant aux trois étapes de déroulement de notre étude.

- 1 – Dans un premier temps, une étude sur les procédés de fabrication du Nem chua au Sud-Vietnam a été effectuée dans trois régions connues pour cette spécialité. Cette étude nous a permis d’avoir une vue globale des procédés de fabrication et les facteurs qui peuvent influencer la qualité des produits. Une telle étude a été nécessaire en absence de données concrètes et objectives sur la diversité des pratiques locales.
- 2 – Dans un deuxième temps, des études sur la flore lactique du Nem chua ont été réalisées dans quatre unités de production du Sud Vietnam. Des prélèvements ont été effectués au cours des différentes étapes de fabrication des Nem chua. Ce travail nous a permis de créer une banque de souches lactiques indigènes du Nem chua. Cette étape était un préalable indispensable pour le choix et la formulation des ferments lactiques qui seront utilisés comme starters.
- 3 – Nous avons ensuite réalisé des essais de formulation des starters isolés précédemment. Les souches ont été choisies pour leur "potentiel de croissance" et les combinaisons ont été retenues sur la base des évaluations sensorielles des produits finis par des épreuves hédoniques et descriptives. Pour la meilleure combinaison de starters, une étude de l’évolution des différentes souches a été réalisée. En plus, une caractérisation plus précise des souches retenues a été effectuée. Cette étude avait pour but de déterminer leurs caractères et leur intérêt en tant que starter.

Le manuscrit se termine par une partie de "conclusion et perspectives" qui reprend les résultats les plus importants de cette étude et leur impact sur le développement de la phase d’industrialisation du Nem chua. Les souches isolées dans le Nem chua et bien adaptées au substrat carné pourraient s’avérer être de bons starters pour la fabrication d’autres produits du Sud-Est asiatique, aux procédés de fermentation similaire, sous réserve, comme pour le Nem chua, de bons résultats d’analyses organoleptiques.

Partie I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. FLORE MICROBIENNE DE LA VIANDE ET DES PRODUITS CARNES

La viande est considérée comme un aliment de choix en raison de sa valeur nutritive. Sa richesse en protéines et la nature de celles-ci en font un aliment indispensable pour une ration alimentaire équilibrée. Toutefois, la viande est aussi un substrat favorable au développement des micro-organismes, essentiellement des bactéries protéolytiques qui entraînent des modifications néfastes sur l'odeur, la couleur, la texture et produisent des substances toxiques. C'est donc une matière première fragile qui doit être strictement surveillée en raison du danger dû à ces altérations et à la présence éventuelle de germes pathogènes (Guiraud *et al.*, 2003 ; Larpent *et al.*, 1997).

1.1. Microflore de la viande

1.1.1. Flore endogène et contaminations

La chair d'un animal sain vivant est pratiquement stérile. L'invasion des tissus animaux par les microorganismes dépend de plusieurs facteurs tels que : l'état de santé de l'animal et les diverses sources de contamination. Les principaux contaminants de surface de la viande proviennent des conditions d'abattage (environnement de l'abattoir, opérations de découpe et d'éviscération...). La non-maîtrise de ces étapes est une cause fréquente de toxi-infections alimentaires et doit faire l'objet de pratiques très strictes. Les conditions d'entreposage (temps et température) influent aussi sur la pénétration des microorganismes dans les tissus.

L'état de santé de l'animal avant l'abattage (y compris les stress lors du transport, de la stabulation...) peut aussi avoir une influence sur la qualité microbiologique de la viande.

La flore contaminante peut provenir de l'animal lui-même ou du personnel porteur sain affecté à la découpe. Dans ce dernier cas, il s'agit de contaminations accidentelles et elles ne font donc pas partie de la flore contaminante normale des viandes (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*). Il en est de même pour les conséquences des éviscérations.

En ce qui concerne la source animale, les contaminations sont essentiellement bactériennes et peuvent provenir : (1) de la peau (microcoques, *Pseudomonas* dont

Ps. fluorescens, *Ps. fragi*, *Ps. putida* et autres germes de la flore banale Gram (-), staphylocoques dont *St. aureus*, lactobacilles, streptomycètes, *Listeria...*) et (2) du tube digestif des animaux par mauvaise pratique d'éviscération (coliformes dont *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, streptocoques fécaux).

Globalement, il existe beaucoup de contaminations croisées dans les abattoirs. Des germes banaux et des germes néfastes, au point de vue sanitaire, sont souvent isolés des viandes. Parmi les germes provenant de l'air, du sol, des manipulateurs et éventuellement de l'eau de lavage, les *Pseudomonas* sont les plus importants, suivis des autres germes Gram (-) comme les coliformes et les entérobactéries. On retrouve également des bactéries à coloration Gram positive, sporulées ou non, comme *Bacillus* (dont *Ba. cereus*), *Clostridium* (*Cl. perfringens* et éventuellement *Cl. botulinum*), *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, des bactéries corynéformes (*Brochothrix thermosphacta*). D'autres microorganismes comme les levures et spores de moisissures (*Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Monilia*) sont également présents (Jay *et al.*, 2000). La contamination par les insectes peut être importante dans le cas d'exposition à la vente (Nychas *et al.*, 2008).

Les principaux genres de bactéries, levures et moisissures de la viande sont listés dans les tableaux⁽¹⁾ I et II. Les animaux malades peuvent être sources de toxi-infections chez l'homme. Les maladies les plus fréquentes sont la salmonellose, la campylobactériose et la listériose. Parmi ces pathogènes, toutes les espèces d'un genre ne sont pas forcément pathogènes et à l'intérieur d'une espèce, toutes les souches ne sont pas également dangereuses pour l'homme. C'est le cas par exemple pour *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*... Actuellement, on rencontre de plus en plus des bactéries très pathogènes pour l'homme et émergentes comme les *E. coli* entérohémorragique (*E. coli* O157 : H7). Malheureusement, les animaux porteurs de bactéries pathogènes sont souvent porteurs sains et ne peuvent pas être éliminés de la filière d'abattage. D'autres bactéries qui sont pathogènes des animaux sont, très exceptionnellement, transmissibles à l'homme, comme *Brucella* (brucellose), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (rouget), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Bacillus anthracis* (charbon) et *Pasteurella tularensis* (tularémie) (Guiraud *et al.*, 2003).

Tableau(1) I – Genres bactériens les plus fréquents dans la viande

Genres	Gram (+)	Viandes fraîches réfrigérées	Viande de volaille	Genres	Gram (-)	Viandes fraîches réfrigérées	Viande de volaille
<i>Bacillus</i>	+	X	X	<i>Acinetobacter</i>	-	XX	XX
<i>Brochothrix</i>	+	X	X	<i>Aeromonas</i>	-	XX	X
<i>Carnobacterium</i>	+	X		<i>Alcaligenes</i>	-	X	X
<i>Caseobacter</i>	+	X		<i>Arcobacter</i>	-	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	X	<i>Campylobacter</i>	-		XX
<i>Corynebacterium</i>	+	X	XX	<i>Citrobacter</i>	-	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X	<i>Enterobacter</i>	-	X	X
<i>Erysipelothrix</i>	+	X	X	<i>Escherichia</i>	-	X	X
<i>Kocuria</i>	+	X		<i>Flavobacterium</i>	-	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	XX	<i>Hafnia</i>	-	X	X
<i>Lactobacillus</i>	+	X		<i>Moraxella</i>	-	XX	X
<i>Lactococcus</i>	+	X		<i>Pantoea</i>	-	X	X
<i>Leuconostoc</i>	+	X		<i>Proteus</i>	-	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	XX	<i>Pseudomonas</i>	-	XX	XX
<i>Microbacterium</i>	+	X	X	<i>Psychrobacter</i>	-	XX	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	XX	<i>Salmonella</i>	-	X	X
<i>Paenibacillus</i>	+	X	X	<i>Serratia</i>	-	X	X
<i>Pediococcus</i>	+	X		<i>Shewanella</i>	-	X	
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X	<i>Yersinia</i>	-	X	
<i>Vagococcus</i>	+		XX				
<i>Weissella</i>	+	X					

Remarque : X = présent ; XX = fréquent

(Source : d'après Jay *et al.*, 2000)

Tableau(1) II – Genres de moisissures et de levures les plus présentes dans les viandes

Genres	Viandes fraîches et réfrigérées	Viande de volaille	Genres	Viandes fraîches et réfrigérées	Viande de volaille
<i>Moisissures</i>			<i>Levures</i>		
<i>Alternaria</i>	X	X	<i>Candida</i>	XX	XX
<i>Aspergillus</i>	X	X	<i>Cryptococcus</i>	X	X
<i>Aureobasidium</i>	X		<i>Debaryomyces</i>	X	XX
<i>Cladosporium</i>	XX	X	<i>Hansenula</i>	X	
<i>Eurotium</i>	X		<i>Pichia</i>	X	X
<i>Fusarium</i>	X		<i>Rhodotorula</i>	X	XX
<i>Geotrichum</i>	XX	X	<i>Saccharomyces</i>		X
<i>Monascus</i>	X		<i>Torulopsis</i>	XX	X
<i>Monilia</i>	X		<i>Trichosporon</i>	X	X
<i>Mucor</i>	XX	X	<i>Yarrowia</i>		X
<i>Neurospora</i>	X				
<i>Penicillium</i>	X	X			
<i>Rhizopus</i>	XX	X			
<i>Sporotrichum</i>	XX				
<i>Thamnidium</i>	XX				

Remarque : X = présent ; XX = fréquent.

(Source : d'après Jay *et al.*, 2000)

1.1.2. Evolution de la microflore et dégradation de la viande

L'altération de la viande peut être considérée comme un phénomène écologique qui comprend les changements au niveau des substrats disponibles (par exemple, les composés à faibles poids moléculaires...) durant la prolifération de la flore microbienne de la viande au cours de la conservation. Elle est essentiellement due aux activités des enzymes protéolytiques et lipolytiques d'origine microbienne (Nychas *et al.*, 2008).

En général, la flore microbienne d'altération de la viande se développe en fonction de la composition biochimique et de ses conditions de stockage (Guiraud *et al.*, 2003 ; Davies *et al.*, 1998 ; Larpent *et al.*, 1997).

A une température inférieure à +7 °C en atmosphère sèche, la surface des pièces de découpe primaire de la carcasse se déshydrate et n'autorise que le développement de micro-organismes à la fois xérophiles et psychrotrophes. Les micromycètes, *Cladosporium*, *Sporotrichum* ou *Thamnidium* y ont été détectés et cités comme étant les agents principaux de l'altération microbienne. En cas de stockage de ces mêmes viandes en atmosphère humide, le développement des bactéries du genre *Pseudomonas* ou de la famille des *Enterobacteriaceae* est favorisé (Bornert, 2000 ; Rosset *et al.*, 1974).

La viande issue de l'abattoir peut être stockée au froid et dans différentes conditions d'emballage avant d'être, soit consommée, soit utilisée comme matière première. De nombreux auteurs ont étudié l'évolution de ces flores dans ces diverses conditions.

Dans le cas de conservation au froid positif, la prédominance du genre *Pseudomonas* a été montrée sur la viande réfrigérée. Ces bactéries psychrophiles à activité protéolytique et lipolytique sont à l'origine des principales altérations, en particulier les phénomènes de poissage et de limonage ainsi que les odeurs dites "de torchon sale" de la viande réfrigérée. Les genres *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* sont aussi des agents possibles de ce type d'altération (Ntzimani, *et al.*, 2008 ; Olofsson *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2006 ; Koutsoumanis *et al.*, 2006).

En dehors de l'existence de la flore psychrotrophe, des *Pseudomonas* spp. et des *Brochothrix thermosphacta*, Rodriguez-Calleja *et al.* (2005) ont également été détectées des bactéries lactiques et des *Enterobacteriaceae* dans la viande de lapin stockée à basse température et en aérobiose. Dans une certaine mesure, l'existence des bactéries lactiques est bonne pour le produit car si ces dernières sont convenablement contrôlées, elles

contribuent à la conservation de la viande. Par contre, un développement trop important de celles-ci conduit à un goût acide prononcé de la viande.

Une équipe des chercheurs italiens a évalué et comparé la flore microbienne existant dans la viande commercialisée et conservée au froid de cinq espèces animales : le porc, le bœuf, le cheval, la chèvre et le cerf. Les bactéries mésophiles aérobies, les lactobacilles et les *Pseudomonas* sont démontrés comme étant les flores typiques de ces matières premières. Des souches de *Staphylococcus aureus* et des coliformes étaient également présents dans tous les échantillons examinés (Paleari *et al.*, 2002).

La diversité et l'évolution microbienne de la viande réfrigérée du porc (*Longissimus*) en fonction du temps de stockage et du mode d'emballage a été également étudiée par Li et ses collaborateurs (2006) en utilisant la technique DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Neuf genres bactériens ont été identifiés : *Arthrobacter* ssp., *Enterococcus* ssp., *Staphylococcus* ssp., *Moraxella* ssp., *Pseudomonas* ssp., *Lactobacillus* ssp., *Aeromonas*, *Acinetobacter* ssp. et *Brochothrix thermosphacta*.

Les entérobactéries, en particulier le genre *Proteus*, deviennent la flore dominante de la viande exposée à une rupture de la chaîne du froid. La viande subit un autre type d'altération : la putréfaction verte, liée à une reprise d'activité de flores non psychrotrophes au détriment des *Pseudomonadaceae* (Guiraud *et al.*, 2003 ; Bornert, 2000).

La vitesse d'apparition et le type d'altération peuvent être aussi très largement influencés par les technologies utilisées, en particulier le mode de conditionnement de la denrée, qui constituent des moyens de maîtrise de l'activité de la flore psychrophile. Alonso-Calleja *et al.* (2004) ont remarqué la diminution des *Pseudomonas* au cours du stockage des steaks hachés emballés sous vide. Par contre, une augmentation du nombre des bactéries lactiques et des *Enterococcaceae* a été notée. Ces microorganismes sont capables de se développer dans un milieu anaérobie et sont responsables de l'altération des viandes emballées sous vide.

Le CO₂ a un effet bactériostatique contre les bactéries psychrophiles. Une diminution du nombre des *Pseudomonas* a été notée dans la viande conditionnée sous atmosphère modifiée (enrichie en CO₂) (Fernández-López *et al.*, 2008 ; Mc Millin, 2008 ; Ntzimani *et al.*, 2008). Par contre, ces conditions anaérobies favorisent la croissance des bactéries lactiques. Au cours du stockage de ce type de viande, la population lactique augmente significativement par rapport à une viande sous emballage normal (Barakat *et*

al., 2000). Les modes de conditionnement n'influencent pas le développement des *Enterococcaceae* (Fernández-López *et al.*, 2008 ; Seydim *et al.*, 2006).

1.1.3. Moyens de réduction de la charge microbienne de la viande

En général, les méthodes de décontamination créent les conditions nécessaires pour maîtriser et réduire la flore microbienne de la viande (Huffman, 2002).

Il existe de nombreuses méthodes basées sur des principes différents : certaines utilisent des moyens physiques (température, pression, champs électriques pulsés, rayonnements ionisants..), d'autres chimiques (conservateurs, huiles essentielles...). Les propriétés antagonistes des bactéries sont également utilisables.

Les huiles essentielles notamment celles de *Cinnamomum cassia*, *Origanum compactum* et *Origanum heracleoticum* ont montré une forte activité antimicrobienne contre les *Pseudomonas putida* isolées de la viande (Oussalah *et al.*, 2006). Blaszyk et Holley (1998) ont proposé d'utiliser le monolaurine, l'eugénol (composé phénolique) et le citrate de sodium pour inhiber la flore d'altération de la viande (*Lactobacillus curvatus*, *Lb. sake*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Brochothrix thermosphacta*) et les bactéries pathogènes comme les *E. coli* O157:H7, les *Listeria monocytogenes*. Les acides acétique et lactique ont également été testés contre ces dernières, à la surface des carcasses (Río *et al.*, 2008 ; Drosinos *et al.*, 2006 a ; Pipek *et al.*, 2005 ; 2006 ; Gill *et al.*, 2004 ; Stopforth *et al.*, 2003). Dans l'étude de Nadarajah *et al.* (2005), l'isothiocyanate d'allyle utilisé à des doses de 5 – 10 % peut tuer les *E. coli* O157:H7 inoculés dans la viande de bœuf réfrigérée et conditionnée sous azote. Le potentiel antibactérien du chitosane a été démontré par Kanatt *et al.* (2008) dans la conservation de la viande et des produits carnés.

L'irradiation est considérée comme une méthode de décontamination performante et polyvalente en industrie agro-alimentaire, principalement pour la viande rouge, la volaille, les ovoproduits et les produits à base de poisson. Les traitements à doses de 2 – 7kGy, en fonction des conditions d'irradiation et du produit, peuvent éliminer efficacement les bactéries pathogènes non sporulées telles que les *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli* O157:H7 (Thayer, 2001). Une étude de décontamination, par les radiations ionisantes de la viande fraîche utilisée comme matière première pour la fabrication des saucisses fermentées, a été publiée en 2006. Selon ces auteurs grecs, un traitement de la viande par des rayonnements à la dose de 2 ou 4 kGy élimine les *Listeria* spp. et réduit un nombre important des *Pseudomonas*, des

entérocoques, des staphylocoques pathogènes et des entérobactéries dans la viande fraîche traitée. Les *Pseudomonas* sont très sensibles et les levures sont les plus résistantes. Les starters, *Lb. pentosus* et *St. carnosus*ensemencés, post traitement ionisant, dans la pâte de viande, ne sont pas affectés (Chouliara *et al.*, 2006).

Cependant, les stratégies de réduction des bactéries de la flore d'altération ainsi que des pathogènes citées ci-dessus ne sont pas sélectives et par conséquent, les autres bactéries de la flore microbienne des aliments peuvent également être inactivées.

La biopréservation est basée sur l'utilisation de microflore (naturelle et/ou contrôlée) et/ou des substances antibactériennes produites par cette dernière. La présence et/ou la croissance de bactéries lactiques dans la matrice de viande peut inhiber le développement des pathogènes par plusieurs mécanismes, spécialement ceux des bactériocines. Les applications des bactéries lactiques produisant des bactériocines sont très prometteuses en sécurité alimentaire en association (Hurdle Technology) avec d'autres techniques de préservation des aliments (Ammor *et al.*, 2006 ; Budde *et al.*, 2003 ; Lücke *et al.*, 2000).

1.2. Microflore des produits carnés

La viande est un produit très périssable. Plusieurs traitements de conservation et de transformation de la viande permettent de prolonger la durée d'utilisation du produit et de diversifier leur présentation, telles que séchage, salage, fumage, fermentation, maturation, cuisson... C'est pourquoi une large gamme de produits carnés est présente sur les marchés mondiaux afin de satisfaire les demandes des consommateurs, tant au point de vue hédonique qu'au niveau nutritionnel.

1.2.1. Flore microbienne de la viande séchée

Le séchage de la viande provoque une forte diminution de l'activité de l'eau. La microflore est souvent stabilisée dans la viande séchée. Les substances antibactériennes de la fumée peuvent de plus supplémentairement entraîner une certaine action antiseptique. La plupart des altérations de ce type de produit proviennent d'une augmentation de l'humidité, ce qui induit un sùrissement dû au développement des bactéries lactiques ou des coliformes, ainsi que l'apparition de couleurs diverses sur le produit ou la formation de zones spongieuses sous l'action des *Bacillus* (Guiraud *et al.*, 2003 ; Jay *et al.*, 2000).

L'utilisation des nitrates et nitrites est très connue en alimentaire. Leurs avantages technologiques sont incontournables dans la fabrication des produits carnés (conservateur alimentaire, responsable de la flaveur typique des salaisons, colorant irremplaçable de la couleur rouge rosé des produits carnés,...). En raison de leur toxicité pour l'homme, ils sont autorisés à dose strictement contrôlée afin d'assurer la sécurité alimentaire. Certaines études, s'intéressant aux effets des nitrites et nitrates sur les changements de l'association microbienne des saucisses sèches, ont montré une stimulation de la croissance des bactéries lactiques durant l'étape de pré-maturation. Par contre, les nitrites empêcheraient le développement des psychrotrophes et des *Staphylococcus* dans ces produits (Honikel *et al.*, 2008 ; Marco *et al.*, 2006 ; Sanz *et al.*, 1998). Cette diminution était plus importante après 45 jours de séchage pour les produits contenant des nitrites que pour ceux avec nitrates.

1.2.2. Flore microbienne de la viande salée

Le sel a un effet bactériostatique sur de nombreuses bactéries, en particulier les bactéries à coloration de Gram négatif. Les dégradations de la viande salée sont dues à des germes halotolérants généralement introduits par un mauvais salage. Le sùrissement des viandes salées est dû aux lactobacilles, aux *Leuconostoc* et aux *Micrococcus* (Bjorkroth *et al.*, 2005). Les moisissures peuvent provoquer viscosité, aspect et colorations indésirables. La présence des *Enterococcus faecalis* est généralement remarquée (Omar *et al.*, 2004).

Les viandes salées et séchées peuvent héberger des pathogènes pour l'homme (*Clostridium botulinum* et *Staphylococcus aureus*). Une concentration suffisante en sel nitraté ainsi qu'en sel nitrité permet d'inhiber leur développement (Marco *et al.*, 2006 ; González *et al.*, 2002).

Certaines viandes salées subissent des processus de maturation microbienne souhaitables. Ces maturations sont souvent l'œuvre de bactéries lactiques : les produits de leur métabolisme participent à l'amélioration des qualités organoleptiques et l'acidité produite empêche le développement des bactéries indésirables. Dans un jambon salé cru par exemple, ces fermentations sont l'œuvre de lactobacilles, microcoques, entérocoques, *Leuconostoc*... (Guiraud *et al.*, 2003).

1.2.3. Flore microbienne des produits carnés fermentés

La fermentation est l'une des technologies les plus anciennes utilisées pour la conservation des aliments. Au cours des siècles, elle s'est affinée et diversifiée. Il existe de nombreux types de produits carnés fermentés. Parmi les principaux, nous trouvons les saucissons secs et les saucisses fermentées. Les saucisses fermentées peuvent être classées en deux catégories selon leur degré de séchage et leur pH final : les saucisses fermentées demi-séchées ou séchées.

- Les saucisses fermentées demi-séchées se caractérisent par une fermentation rapide (de plus ou moins 18 h selon le diamètre du produit) à des températures relativement élevées (entre 32,5 °C et 38,1° C), et avec une humidité relative (HR) d'environ 90 %. Leur pH final est souvent en dessous de 4,7. Cette valeur peut s'étendre de 4,7 à 5,3 selon le type de produit et les spécifications des fabricants. L'humidité du produit fini est généralement importante (de 40 % à 60 % d'eau), due à l'absence de période de séchage (Baracco *et al.*, 1999 ; Girard *et al.*, 1990).
- Les saucisses fermentées séchées subissent, elles, une fermentation lente de plusieurs jours à des températures relativement basses (de 15 °C à 26 °C) avant d'être séchées pendant plusieurs semaines en chambre froide. En réalité, ces paramètres peuvent varier en fonction de la température optimale du starter utilisé. Aux Etats-Unis, la température lors de la phase fermentaire est souvent élevée (37,8°C – 43,3°C) avec une durée de moins de 24 h. L'activité de l'eau (Aw) du produit passe initialement de 0,96 à 0,81 en fin du séchage (Getty, 2005).

Quels que soient les produits, il se déroule une fermentation naturelle due au développement d'une flore microbienne qui est fonction de la contamination initiale et des conditions de préparation.

Les saucissons fabriqués dans le sud de l'Europe, comme le saucisson français, subissent un affinage très long au cours duquel se succèdent des flores microbiennes différentes. Ce sont essentiellement des *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* sans oublier des levures et des moisissures (Larpen *et al.*, 1997). Les bactéries à Gram négatif disparaissent rapidement et laissent la place aux bactéries lactiques. Les lactobacilles se développent d'abord et provoquent une acidification du milieu. Les microcoques, streptocoques et pédiocoques contribuent ensuite à l'amélioration de la qualité organoleptique du produit (Dalmış *et al.*, 2008 ; Antara *et al.*, 2004 ; Tjener *et al.*, 2004 a). Cet aspect séquentiel dans la fermentation devra être pris en compte dans notre

étude pour la sélection des souches starters, car ce ne sont pas forcément les bactéries récoltées sur des produits finis qui seront les meilleures candidates pour initier, en tant que starter, les fermentations.

Plusieurs études concernant les saucisses fermentées montrent la prédominance des lactobacilles au cours de la fermentation. Les *Lactobacillus sakei* et *Lb. curvatus* sont les espèces prédominantes dans la flore microbienne des produits (Bonomo *et al.*, 2008 ; Di Cagno *et al.*, 2008 ; Cocolin *et al.*, 2007 ; García Fontán *et al.*, 2007 ; Ferreira *et al.*, 2007 ; Rantsiou *et al.*, 2004, 2005, 2006). Les autres lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. alimentarius*, *Lb. paracasei*) ont été notés dans certains produits (Benito *et al.*, 2008 ; García Fontán *et al.*, 2007 ; Rantsiou *et al.*, 2005). Dans la plupart des études, les microcoques sont présents, mais en quantité plus faible, par rapport aux lactobacilles (Aquilanti *et al.*, 2007 ; Drosinos *et al.*, 2005 ; Ferreira *et al.*, 2006). Par contre, Benito *et al.* (2008) ont remarqué la prédominance des *Pe. acidilactici* dans la flore lactique des saucisses séchées de l'Espagne, fermentées naturellement.

La diversité de la communauté des staphylocoques dans les saucisses séchées fermentées a été montrée par Morot-Bizot *et al.* (2006). Les *Staphylococcus equorum* et *St. succinus* étaient les plus dominants. Les *St. saprophyticus*, *St. xylosus*, *St. carnosus*, *St. simulans* et *St. warneri* existaient en pourcentages plus faibles.

La présence des bactéries pathogènes est très limitée dans ces produits. On peut y rencontrer parfois des *Bacillus* (*B. cereus*), des *Clostridium* (*Cl. perfringens*) et des staphylocoques entérotoxiques (Ferreira *et al.*, 2006 ; Guiraud *et al.*, 2003 ; Bourgeois *et al.*, 1996).

L'étude de la microflore du Nham – produit carné traditionnel de Thaïlande, de type saucisse fermentée et fabriquée à base de maigre (80 %) et de couenne cuite de porc (12 %), montre l'existence des *Pediococcus* ssp., *Pe. cerivisiae*, *Lactobacillus plantarum* et *Lb. brevis* dans les produits finis (Valyasevi *et al.*, 2002).

Jusqu'à ce jour, il existe très peu de publications concernant les populations microbiennes des produits carnés fermentés d'Asie. Les études microbiologiques y sont essentiellement consacrées à la qualité hygiénique des matières premières et des produits finis. Les résultats des recherches de la flore lactique du Nem chua (Vietnam) montrent la présence des lactobacilles, pédiocoques et microcoques dans ce produit (Phan *et al.*, 2005 ; Nguyen *et al.*, 2002).

1.3. Maîtrise de la qualité microbiologique en industrie agro - alimentaire

Connaissant la tendance des consommateurs pour les "produits naturels", beaucoup d'industriels de l'alimentaire adaptent leur processus de fabrication à cette nouvelle demande. Dans cette optique, il est intéressant de pouvoir développer des produits ayant subi le moins de traitements possibles, tant aussi bien dans la fabrication (traitements thermiques...) que dans la formulation (conservateurs), tout en garantissant une conservation la plus longue possible sans risque sanitaire.

Les méthodes analytiques employées pour détecter la présence de contaminants ont significativement avancé au cours de ces dernières années (McClure *et al.*, 2000). Elles ne peuvent cependant, à elles seules, détecter des défauts sanitaires ayant une faible fréquence absolue dans un lot de production (problème de la représentativité de l'échantillonnage) mais, suffisamment importantes pour donner des toxi-infections alimentaires collectives (donc préjudiciables au consommateur et à l'entreprise transformatrice). Plusieurs outils pour éviter les accidents d'origine microbiologique ont été développés dans le domaine industriel pour maîtriser la qualité des produits. Ces outils visent à assurer la qualité des produits manufacturés du point de vue sanitaire, mais aussi organoleptique. Nous pouvons citer par exemple le système AMDE ou AMDEC (analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité) et le système HACCP (Hazard analysis critical control point) (Guiraud *et al.*, 2003).

L'HACCP est une démarche mondialement rependue car c'est un pilier de la norme ISO 22 000. Cette norme récente donne les principes pour assurer au consommateur la sécurité sanitaire des produits et prend en compte toute la filière agro-alimentaire (en amont et en aval des industries transformatrices). Cette norme est d'autant plus importante qu'elle a été adoptée par les pays membres de l'OMC et est donc incontournable dans l'échange des produits alimentaires internationaux. L'efficacité d'une démarche HACCP repose sur une bonne connaissance des risques liés aux dangers biologiques (microbiologiques), chimiques et physiques. En général, la viande est associée à une large variété des microorganismes pathogènes dont certains sont très connus. La plupart d'entre eux ont pour origine l'intestin des animaux, mais ils peuvent être introduits directement ou indirectement dans l'aliment au cours de sa fabrication. Leur circuit de contamination est parfois complexe et des agents technologiques comme les opérateurs, l'eau, l'air, peuvent être des vecteurs intermédiaires de contamination. Pour appliquer un système HACCP dans la fabrication des produits fermentés, il est nécessaire, au préalable, que les bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène soient mises en place. Ces bonnes pratiques sont

appelées des PRPs (Pre Requisitioned Programs). Les points critiques dans une production sont des points sensibles au niveau desquels sont réalisées des mesures (dénombrement de microorganismes par exemple) et dont la comparaison, par rapport à des limites, donnera un jugement rapide sur la qualité du produit fini.

En parallèle, la microbiologie prédictive s'est développée. Nous pouvons trouver les modèles tels que Growth Predictor (auparavant Food micromodel, FSA-UK, www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor) et Pathogen Modeling Program (USDA-USA, www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm), qui permettent de comprendre l'évolution théorique des flores d'un produit et de définir les conditions de fabrication et de traitement permettant d'assurer une bonne sécurité (Danilo *et al.*, 2006 ; Baranyi *et al.*, 2004).

La modernisation et la mise à jour des systèmes de gestion de sécurité alimentaire sont absolument primordiales. L'automatisation des diverses étapes de la production n'a pas influencé le type de risques et le nombre de points de commande critiques ; à *contrario*, elle a mené à la réduction de la flore totale, des coliformes et d'*Escherichia coli*, des *Staphylococcus aureus* (approximativement de 10 UFC.g⁻¹) aux diverses étapes du processus d'abattage des volailles (Tsola *et al.*, 2008).

Chapitre 2. BACTERIES LACTIQUES

Le terme de bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis* – probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits. D'un point de vue technologique, les genres cités ci-après sont considérés comme les principaux des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* (Axelsson, 2004 ; Guiraud *et al.*, 2003 ; Limsowtin *et al.*, 2004 ; Klein *et al.*, 1998).

2.1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Ce sont des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (Larpent *et al.*, 1997 ; Bourgeois *et al.*, 1996).

Le manganèse joue un rôle important pour les bactéries lactiques en les protégeant de la toxicité de l'oxygène. Accumulé dans la cellule, cet élément est comparable à la superoxyde dismutase qui décompose les superoxydes. Depuis longtemps, nous savons que les composants des épices stimulent la production d'acide lactique par les cultures starters. Zaika et Kissinger (1984, cité par Hagen *et al.*, 2000) ont prouvé que le manganèse est le seul composant des épices qui ait cette propriété. Le métabolisme des bactéries lactiques dépend des quantités du Mn^{2+} présent dans le milieu de culture et le besoin en Mn^{2+} diffère d'une espèce lactique à l'autre. Dans la viande, le taux en manganèse est faible et

l'addition de Mn^{2+} peut stimuler considérablement la croissance des lactobacilles durant la fermentation (Leroy *et al.*, 2004).

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO_2 . Beaucoup de *Lactobacillus* homofermentaires produisent normalement, en dehors de l'acide lactique, du formate, de l'éthanol et de l'acétate sous certaines conditions. Il ne s'agit pas d'une déviation vers la voie des pentoses mais une partie du pyruvate est transformée en acétyl CoA. En condition d'excès de nutriments, le pyruvate est converti en lactate, mais en condition de carence, une partie de pyruvate est métabolisée en éthanol et acétate. Ce mécanisme est de meilleur rendement énergétique pour la bactérie car de l'ATP est synthétisé durant la conversion du pyruvate en acétate (Bourgeois *et al.*, 1996).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, sur la peau, dans le système digestif, la muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogènes. Elles survivent dans un milieu à faible A_w , et résistent à l'éthanol (10 – 15 % éthanol) et au CO_2 .

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection. Les bactéries lactiques tolèrent en effet des pH acides (pH = 5 et parfois moins). A ces pH, et à *fortiori* pour des pH inférieurs, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agro alimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. Il apparaît donc que les produits fermentés puissent être considérés comme "à faible risque" vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide, comme de nombreuses levures et moisissures (Nielsen *et al.*, 2008 ; Sachindra *et al.*, 2005).

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie agro-alimentaire. Chez certains industriels, le suivi de l'acidification est une garantie, quand la cinétique est correcte, d'un produit bien fait et sans développement de pathogènes. La croissance excessive des bactéries lactiques pourrait, par contre, être néfaste dans certains cas, en entraînant par exemple un sûrissement du goût du vin, de la bière, des viandes, du jus de fruit...) (Guiraud *et al.*, 2003).

2.2. Classification

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous-espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union internationale de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg, 2001).

Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques, ...

D'après Ludwig *et al.* (2008), le phylum *Firmicutes* comprend trois classes : *Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel de Bergey Trust (2008).

2.2.1. Classification au niveau du genre

Les genres principaux de bactéries lactiques associées aux aliments sont les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Klein *et al.*, 1998). Dans le manuel de Bergey publié en 1957, les *Bifidobacterium* étaient répertoriées comme étant des *Lactobacillus bifidum* (Axelsson *et al.*, 2004). Ces microorganismes, considérés souvent comme de véritables bactéries lactiques, sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de GC (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/tactinobacteria.html>)

L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus sensu stricto*, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé : les *Vagococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Un autre groupe de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* a formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus*. Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helocococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec le groupe des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués. La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins *et al.*, 1993). En outre, la division cellulaire en deux directions perpendiculaires sur un seul plan (autrefois décrite incorrectement comme « divisée en deux plans »), est utilisée comme la caractéristique clé dans la différenciation des coques. Les genres formant les tétrades sont les *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* (Simpson *et al.*, 1995).

Une autre caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres de bactéries lactiques est le type fermentaire du glucose dans des conditions standardisées, c'est-à-dire avec des concentrations non limitées du glucose et de facteurs de croissance (acides aminés, vitamines et les précurseurs d'acide nucléique), et une disponibilité limitée en oxygène limitée. Sous ces conditions, les bactéries lactiques se divisent en deux groupes : homofermentaire et hétérofermentaire. Dans la pratique, le test de production de gaz à partir du glucose permettra de discriminer les groupes. Les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et un sous-groupe de *Lactobacillus* sont hétérofermentaires ; toutes les autres bactéries lactiques sont homofermentaires.

La croissance à différentes températures est principalement utilisée pour distinguer les coques entre eux. Les *Enterococcus* classiques croissent entre 10 °C et 45 °C, les *Lactococcus* et *Vagococcus* à 10 °C mais pas à 45 °C. En général, les *Streptococcus* ne se développent pas à 10 °C. Leur croissance à 45 °C dépend de l'espèce. La tolérance au sel peut également être utilisée pour différencier les *Enterococcus*, *Lactococcus/Vagococcus* et *Streptococcus*. Seul le genre *Tetragenococcus* tolère 18 % en NaCl. La tolérance aux conditions acides et/ou alcalines peut également être utilisée. Les *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* peuvent se développer à des pH plus élevés que les autres bactéries lactiques. L'analyse de la composition en acides gras peut discriminer le genre *Vagococcus* avec les *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium*. Les *Pediococcus* peuvent être confondus avec les *Aerococcus* à cause de leur similarité morphologique. Toutefois, les *Pediococcus*, plus aérotolérants que les *Aerococcus*, et qui poussent bien en anaérobiose, sont en opposition avec la nature microaérophile des *Aerococcus*. Les caractéristiques des bactéries lactiques sont présentées dans le tableau(1) III.

Tableau(1) III – Quelques caractéristiques de bactéries lactiques (d’après Axelsson, 2004)

Caractéristiques	Bacilles						Coques				
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Production de gaz ^b	- ^c	±	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10 °C	+	±	+	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45 °C	-	±	-	+	-	-	-	±	±	-	-
Croissance dans 6.5 % NaCl	ND ^d	±	+	+	-	-	±	±	-	+	±
Croissance dans 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D, L, DL ^e	L	L	L	L	D	L, DL ^e	L	L	D, DL ^e

Notes :

+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces ; ND : non déterminé.

^a *Weissella* peuvent être également sous forme de bacille.

^b Type de fermentation du glucose : homofermentaire (-) ou hétérofermentaire (+).

^c Faible quantité de CO₂ produite selon le milieu.

^d Peuvent ne pas se développer dans 8 % NaCl.

^e Production d’acide lactique D, L, ou DL acide variable selon les espèces

Cependant, il faut noter qu'il existe des recoupements entre les genres lactiques et le séquençage direct de l'ARNr 16S est considéré comme la méthode de classification la plus précise au niveau du genre (Collins *et al.*, 1991).

2.2.2. Identification et classification au niveau de l'espèce

Comme indiqué ci-dessus, la classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique/biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne, synthétiser certaines enzymes... La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques.

Tous les genres principaux de bactéries lactiques décrits dans les paragraphes suivants sont classés dans les mêmes phylum, classe et ordre :

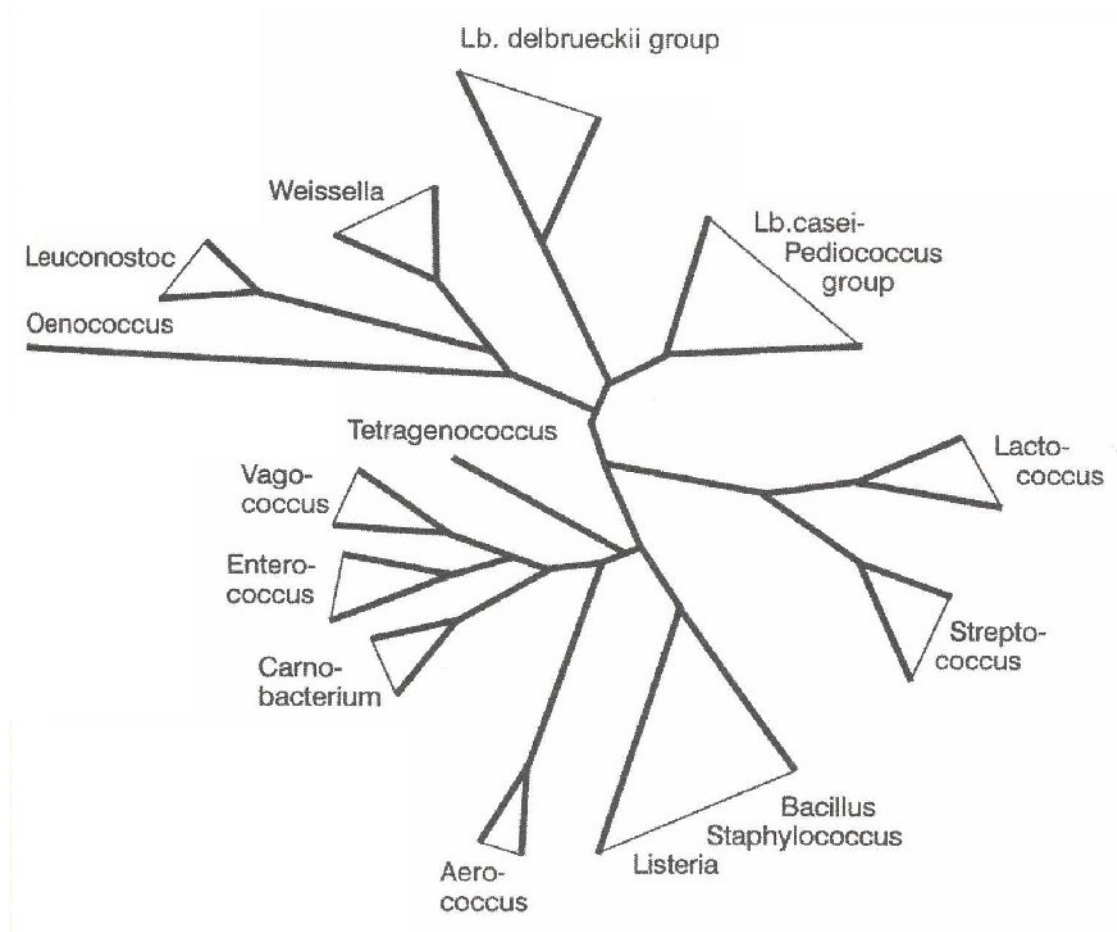
Phylum BXIII : *Firmicutes*

Classe I : *Bacilli*

Ordre II : *Lactobacillales*

Seuls varient les familles et les genres qui seront précisés dans chaque partie.

Un arbre phylogénique représente les différents genres en figure(1) 1.



Figure(1) 1– Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (d’après Axelsson, 2004)

2.2.2.1. Streptocoques et autres coques lactiques

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus*. Ce sont des coques en paire ou en chaîne, Gram +, catalase (-), non sporulés, immobiles et anaérobies facultatifs. Historiquement, la différenciation sérologique de Lancefield était importante dans la classification des streptocoques. A l’heure actuelle, cette méthode est moins appréciée dans la classification mais elle reste toujours utile dans l’identification rapide de la plupart des bactéries pathogènes. Dans l’industrie alimentaire, certaines souches de *Streptococcus* et *Lactococcus* sont utilisées notamment comme agent d’acidification et de coagulation lactique en fromagerie, en salaison et dans la fabrication de yaourts.

a. *Streptococcus*

Famille VI : *Streptococcaceae*

Genre I : *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus sensu stricto* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques.

Le groupe pyogène contient plusieurs streptocoques pathogènes, hémolytiques (hémolyse β) qui nuisent à la santé humaine. Les *Streptococcus pneumoniae*, précédemment inclus dans ce groupe, sont transférés maintenant dans le groupe oral puisqu'ils sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal. En général, les streptocoques pyogènes sont β -hémolytiques tandis que les streptocoques oraux sont α - ou non-hémolytiques. Le groupe oral est divisé en cinq sous-groupes phylogénétiques qui sont respectivement les groupes *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* et *mutans*. Les caractéristiques biochimiques telles que : la fermentation des hydrates de carbones, l'hydrolyse de l'arginine, et certaines activités enzymatiques sont utilisées dans la classification. Les techniques fingerprinting génétiques telles que RFLP, REP-PCR, RAPD-PCR, DGGE-PCR et SDS-PAGE sont également utilisées pour identifier et classer les streptocoques (Desar *et al.*, 2008 ; Huys *et al.*, 2006 ; Koort *et al.*, 2006 ; Piraino *et al.*, 2006 ; Rossetti *et al.*, 2005 ; Furet *et al.*, 2004 ; Rantsiou *et al.*, 2004).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce est l'un des deux ferments (avec *Lactobacillus delbrückii ssp bulgaricus*) impliquée (et obligatoire) pour la dénomination yaourt en législation française et pour certains fromages. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » (Scheilfer, 1987 ; Hardie, 1986) mais ensuite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Sp. salivarius* (Haddie *et al.*, 1995). Une troisième espèce, *Sp. vestibularis* appartient également au groupe des streptocoques (Kawamura *et al.*, 1995). La résistance à la température, la capacité à croître à 52 °C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *Sp. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie *et al.*, 1986).

b. *Lactococcus*

Famille VI : *Streptococcaceae*

Genre II : *Lactococcus*

Les lactocoques sont étroitement associés aux produits laitiers, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière (Teubet *et al.*, 1995). Les *La. garviae* sont souvent associés à la mastite bovine et à la lactococcose des poissons. Trois sous-espèces de *La. lactis* peuvent être distinguées : *La. lactis* ssp. *lactis*, *La. lactis* ssp. *cremoris* et *La. lactis* ssp. *hordniae*. Seules les deux premières sont importantes dans la fabrication des produits laitiers. Les *La. lactis* ssp. *lactis* incluent les espèces qui étaient autrefois désignées *Sp. lactis* ssp. *lactis*, *Sp. lactis* ssp. *diacetyllactis* et *Lactobacillus xylosus* (Schleifer *et al.*, 1987). Le groupe *La. lactis* ssp. *cremosis* comporte les espèces précédemment désignées *Sp. cremoris* ou *Sp. lactis* ssp. *cremoris* qui se différencient de *La. lactis* ssp. *lactis* par l'incapacité à croître à 40 °C mais peuvent se développer dans un milieu à 4 % NaCl, peuvent hydrolyser l'arginine et fermenter le ribose. Les sous-espèces *lactis* et *cremoris* de *La. lactis* sont également séparées par les études d'homologie ADN – ADN et de comparaison des séquences des ARNr 16S. Les caractéristiques biochimiques (par exemple l'utilisation des sucres) peuvent être utilisées pour distinguer les espèces de lactocoques ainsi que les méthodes génétiques (Axelsson *et al.*, 2004).

c. *Vagococcus*

Famille IV : *Enterococcaceae*

Genre II : *Vagococcus*

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles (Teixeira *et al.*, 1999). Les amorces d'oligonucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable (Ammor *et al.*, 2005 ; Endo *et al.*, 2005).

d. *Enterococcus*

Famille IV : *Enterococcaceae*

Genre I : *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques fécaux qui présentent une hémolyse de type λ , β , et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés (*En. durans* et *En. bovis*). Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées. Plusieurs études sur la microflore des fromages traditionnels des pays méditerranéens ont montré que les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages, probablement au travers de la protéolyse et de la lipolyse d'où leur contribution à la flaveur des produits. Ces bactéries sont également trouvées dans les autres produits fermentés tels que les saucisses et les olives (Franz *et al.*, 2003).

Les entérocoques produisent des bactériocines (Moreno *et al.*, 2006 ; Sabia *et al.*, 2003, 2002). D'ailleurs, des préparations d'*En. faecium* (autrefois *Sp. faecium*) et d'*En. faecalis* ont été utilisées en tant que probiotiques (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Guerra *et al.*, 2007 ; Strompfová *et al.*, 2007, 2006 ; Schanrek *et al.*, 2005 ; Burns *et al.*, 2004). Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles. La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'infection causée par les entérocoques résistants à la vancomycine pose un problème clinique grave et par conséquent, l'utilisation de souches d'*Enterococcus faecalis* en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Marteau *et al.*, 2004).

2.2.2.2. *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude récente a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits (Peirson *et al.*, 2003).

a. *Pediococcus*

Famille I : *Lactococcaceae*

Genre III : *Pediococcus*

Sept espèces de *Pediococcus* sont connues : *Pe. acidilactici*, *Pe. damnosus*, *Pe. dextrinicum*, *Pe. inopinatus*, *Pe. parvutus*, *Pe. pentosaceus* et *Pe. urinaeequi*. Collins *et al.* (1990) ont proposé de reclasser la dernière avec le genre des *Aerococcus* mais aucun changement officiel sur cette suggestion n'a été réalisé (Dobson *et al.*, 2002). Avec la transposition de *Pe. urinae-equi* au genre *Aerococcus* et de *Pe. halophilus* au genre *Tetragenococcus*, les *Pediococcus* peuvent être décrits comme les seules coques lactiques acidophiles et homofermentaires. Ils se divisent alternativement dans deux plans ce qui aboutit à la formation de tétrades (Simpson *et al.*, 1995). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Les *Pe. damnosus* sont les microorganismes majeurs de l'altération de la bière à cause de la formation des diacétyl/acétoïne qui créent le goût du beurre. Les *Pe. acidilactici* et *Pe. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ceci a conduit à de nombreuses sélections de souches et l'utilisation comme agents antibactériens ou probiotiques dans la fabrication de produits carnés (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Albano *et al.*, 2007 ; Schneider *et al.*, 2006). Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez *et al.*, 2007 ; Gurira *et al.*, 2005). Les caractéristiques principales pour distinguer les espèces sont : la gamme des sucres fermentés, l'hydrolyse de l'arginine, la croissance à différents pH (de 4,5 à 7,0), et la conformation de l'acide lactique produit. Les *Pe. pentosaceus* et *Pe. acidilactici* sont difficiles à distinguer entre eux par ces caractéristiques mais peuvent être différenciés par l'ARNr 16S (Benito *et al.*, 2008 ; Renouf *et al.*, 2006).

b. *Tetragenococcus*

Famille IV : *Enterococcaceae*

Genre III : *Tetragenococcus*

Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues : *Te. halophilus* (précédemment considérées comme *Pe. halophilus*) et *Te. muriaticus*. Les *Enterococcus solitarius* sont phylogénétiquement liés au *Tetragenococcus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18 % NaCl) et en sont dépendantes pour leur

croissance. Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration de sel élevée par exemple les sauces de soja (Masuda *et al.*, 2008 ; Tosukhowong *et al.*, 2005).

2.2.2.3. *Leuconostoc* et *Weissella*

Les caractéristiques telles que les modes de fermentation des hydrates de carbone, la formation du dextrane, l'hydrolyse de l'esculine, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et températures, l'assimilation du citrate et/ou malate, permettent la différenciation entre les *Leuconostoc* et *Weissella*.

a. *Leuconostoc*

Famille V : *Leuconostocaceae*

Genre I : *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires (voie des hexoses monophosphate). Ils produisent de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol. Ce sont des coques groupés en paires ou en chaînes, catalase (-) (Larpent *et al.*, 1997). Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu (Guiraud *et al.*, 2003).

Le genre *Leuconostoc* a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Ainsi, les *Leuconostoc* sont différents des autres coques par la fermentation hétérolactique et des lactobacilles hétérofermentaires par leur morphologie. Pourtant, il est facile de confondre les *Leuconostoc* et certaines coccobacilles hétérolactiques (Krieg *et al.*, 2001). Les études phylogénétiques des *Leuconostoc* montrent une diversité dans ce genre (Hu *et al.*, 2009 ; Eom *et al.*, 2007 ; Chenoll *et al.*, 2003).

Dans l'industrie laitière, les *Leuconostoc*, principalement les *Le. mesenteroides* ssp. *cremoris*, sont utilisés pour produire des substances aromatiques telles que diacétyl et acétoïne à partir des citrates du lait. Certaines espèces de *Le. carnosum* ont été proposées (Budde *et al.*, 2003) pour la bioconservation des produits carnés emballés sous vide et entreposés au froid, contre les *Listeria monocytogenes*. Ce genre est également important

dans les fermentations naturelles des produits d'origine végétale, par exemple la choucroute ou le kimchi (Eom *et al.*, 2007).

b. *Weissella*

Famille V : *Leuconostocaceae*

Genre III : *Weissella*

Dans la famille des *Leuconostocaceae*, la séparation des *Weissella* du groupe des *Leuconostoc sensu stricto* et de certaines autres bactéries lactiques hétérofermentaires est toujours problématique.

En général, les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles, de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroides* peut produire une pseudocatalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative, aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, chimio-organotrophes, hétérofermentaires stricts, cultivant à 15 °C, ayant des exigences nutritionnelles complexes.

Une étude taxonomique sur des souches bactériennes ressemblant à des *Leuconostoc*, isolées de saucissons secs fabriqués en Grèce, a été réalisée en 1993 par Collins et ses collaborateurs. L'étude des séquences des ARNr 16S permet de classer ces souches dans le groupe constitué par *Leuconostoc paramesenteroides* et cinq espèces de lactobacilles hétérofermentaires. En se basant sur les résultats obtenus, Collins *et al.* (1993) transfèrent l'ensemble de ces espèces dans le nouveau genre *Weissella* et proposent la création de six nouvelles combinaisons (*We. confusa*, *We. halotolerans*, *We. kandleri*, *We. minor*, *We. viridescens* et *We. paramesenteroides*) pour reclasser *Lb. confusus*, *Lb. halotolerans*, *Lb. kandleri*, *Lb. minor*, *Lb. viridescens* et *Le. paramesenteroides* ainsi que la création d'une nouvelle espèce (*Weissella hellenica*) pour les souches isolées de saucissons grecs. Ultérieurement, cinq nouvelles espèces, *We. cibaria*, *We. kimchii*, *We. koreensis*, *We. soli* et *We. thailandensis*, ont été incluses dans le genre *Weissella* sur la base des résultats des homologues ADN - ADN et du séquençage des ARNr 16S (Björkroth *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2002, Choi *et al.*, 2002). En 2004, Ennahar et Cai montrent que *We. cibaria* et *We. kimchii* constituent une unique espèce qui, en fonction des règles de priorité, doit être appelée *We. cibaria*.

Plusieurs espèces de *Weissella* sont associées à la viande et les produits carnés. Ces bactéries peuvent être des agents d'altération à basse température. Les *Weissella thailandensis* ont été isolés de poisson fermenté de Thaïlande (Tanasupawat *et al.*, 2000). Koort *et al.*, (2006) ont identifié les *Weissella viridescens* sur du « Morcilla de Burgos » - un produit carné cuit d'Espagne- par l'analyse des séquences de ARNr 16S.

2.2.2.4. Lactobacilles et autres bactéries lactiques

a. *Lactobacillus*

Famille I : *Lactococcaceae*

Genre I : *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrés comme contaminants.

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, non sporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase (-) (certains ont une pseudo-catalase mais sont benzidine (-), micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂ en plus de l'acide lactique.

Les lactobacilles homofermentaires stricts (par exemple les *Lb. delbrueckii*) utilisent la voie de la glycolyse ; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (par exemple les *Lb. casei*) : ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses ; les pentoses et le gluconate sont fermentés par l'intermédiaire de ce dernier. Les hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*) n'utilisent que le cycle des pentoses. Les lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riches en acides aminés, en vitamines et en acides gras : ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques.

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen (1919) en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel :

➤ Groupe I ou “*Thermobacterium*”

Il comprend les lactobacilles homofermentaires stricts, la plupart étant thermophiles, qui se développent à 45 °C mais pas à 15 °C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages par exemple) sont *Lb. helveticus*, *Lb. jugurti*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. leichamii*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. kefirifaciens*, *Lb. mali*,...

➤ Groupe II ou “*Streptobacterium*”

Il regroupe les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs mésophiles qui se développent à 15 °C. Ces bactéries fermentent les pentoses par la voie hétérofermentaire et les hexoses par la voie homofermentaire. Il comporte les *Lb. casei* qui sont les lactobacilles prédominants du lait, les *Lb. plantarum* rencontrés dans la choucroute, les *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lb. acetotolerans*, *Lb. graminis*, *Lb. rhamnosus*,...présents dans diverses matrices alimentaires végétales et animales.

➤ Groupe III ou “*Betabacterium*”

Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires stricts. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. sanfrancisco*,...

Ces lactobacilles contaminent fréquemment les produits alimentaires et sont les agents de sùrissement. Ils ne sont jamais pathogènes. Dans les viandes, ils provoquent le verdissement par action de l'H₂O₂ qui transforme l'hémoglobine en choléglobine, ou de l'H₂S qui forme de la sulfomyoglobine. Dans les produits conservés par des acides, *Lactobacillus acetotolerant* et les autres lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei* ou *Lb. fructivorans*) peuvent résister et causer des altérations. Dans le cas de l'altération du vin, les *Lactobacillus* ont souvent été incriminés, en particulier les *Lb. hilgardii*, identifiés comme la cause majeure de l'altération (Guiraud *et al.*, 2003).

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire (en laiterie, fromagerie, charcuterie, dans la fabrication de la choucroute, ...). Dans les yaourts, les *Lb. bulgaricus* forment des peptides utilisés ensuite par les *Streptococcus thermophilus*. L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de la thréonine par l'aldolase de

Lb. bulgaricus. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*,...) interviennent pendant l'affinage des fromages. Les *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Lb. bulgaricus* agissent avec les *Streptococcus thermophilus* dans les fromages à pâte cuite. A propos du kéfir, les *Lactobacillus kéfir*, *Lb. kefiranofaciens* et les autres lactobacilles mésophiles ont démontrés leur contribution à la fabrication du produit. Le rôle des lactobacilles est également important dans la fermentation des fruits et légumes (raisin, choucroute, cornichon,...) (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Rodas *et al.*, 2005 ; Edwards *et al.*, 2000).

b. Carnobacterium

Famille III : *Carnobacteriaceae*

Genre I : *Carnobacterium*

Les *Carnobacterium* sont des bacilles hétérofermentaires souvent trouvés dans les viandes de boeuf, de poisson et de volaille emballées sous vide et stockées à basse température (Joffraud *et al.*, 2006 ; Bjorkroth *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2004). D'après l'étude de Brillet *et al.* (2005), les *Carnobacterium divergens* sont des bioconservateurs prometteurs contre les *Listeria monocytogenes*, pour les saumons fumés et conservés au froid. La contribution des *Ca. piscicola* dans la formation de la saveur des saucages fermentés ont été également démontré par Larrouture-Thiveyrat *et al.* (2003).

Ce genre a été créé par Collins *et al.* (1987). Les espèces appartenant à ce genre étaient originellement classées en tant qu'un troisième groupe de lactobacilles sous les désignations *Lb. divergens*, *Lb. carnis* et *Lb. piscicola*. Les études ultérieures ont montré que ces bactéries ont été séparées des lactobacilles et ont justifié la formation d'un nouveau genre. En général, les *Carnobacterium* peuvent croître à un pH relativement élevé (par exemple, pH=9) tandis que les lactobacilles ne peuvent pas s'y développer (Schillinger *et al.*, 1987). En outre, leur composition en acides gras diffère de celle des lactobacilles (Collins *et al.*, 1987). Les *Carnobacterium* sont fréquemment rencontrés dans la viande et les produits carnés où ils sont capables de se développer à faible température.

L'hybridation ADN – ADN permet de faire la distinction entre les *Ca. divergens*, les *Ca. piscicola* et les lactobacilles associés typiques de la viande (Bjorkroth *et al.*, 2005 ; Laursen *et al.*, 2005).

c. *Bifidobacterium*

Phylum : *Actinobacteria*

Classe : *Actinobacteridae*

Ordre : *Bifidobacteriales*

Famille : Bifidobacteriaceae

Genre : *Bifidobacterium*

Les *Bifidobacterium* (l'ancien nom étant *Lactobacillus bifidus*) sont des bacilles présents dans la flore intestinale des nouveaux-nés. Les *Bifidobacterium* sont phylogéniquement proches des actinomycètes alors que les autres bactéries lactiques sont proches des clostridies (Guiraud *et al.*, 2003). Il s'agit des bacilles arrangés en chaînes ou en groupes, non-sporulés, immobiles, catalase (-) et non-filamenteux (Felis *et al.*, 2007 ; Shah *et al.*, 2004).

La commercialisation de préparations du genre *Bifidobacterium* sous forme d'aliments fonctionnels probiotiques a prospéré dans les dernières années. Le but affiché était de proposer un produit bénéfique pour la santé humaine ou animale.

Il y a eu de nombreux changements dans la taxonomie des *Bifidobacterium* et il a été développé de nouvelles applications dans la technologie des aliments. A l'heure actuelle, ils sont utilisés dans la fabrication du yaourt et produits laitiers fermentés (probiotiques). Leur présence entraînerait une protection contre les agents infectieux au niveau intestinal grâce à la présence d'un facteur bifidogène (Søndergaard, 2005). Une application intéressante de ces bactéries est leur utilisation comme agent de biocontrôle dans la fermentation de la viande. L'incorporation des *Bifidobacterium* dans le salami hongrois a été utilisée pour inhiber la croissance des *Listeria monocytogenes* et d'*E. coli* O111 (Pidcock *et al.*, 2002).

2.3. Ferments lactiques et utilisations en agro-alimentaire

2.3.1. Généralités

Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (Holzapfel, 2002).

Dans la fabrication des produits carnés fermentés (cas des saucisses séchées fermentées et leurs dérivés, par exemple), certains fabricants continuent à utiliser la méthode traditionnelle de fermentation naturelle (sans ajouter des starters). Dans ce cas, la fermentation est conduite par la flore indigène qui vient des matières premières utilisées ou de l'environnement. L'ajout dans la pâte de viande d'une partie de la pâte déjà fermentée de la fabrication précédente peut faciliter l'initiation de la nouvelle fermentation (Guiraud *et al.*, 2003).

L'inoculation de la viande avec une culture starter permet d'initier l'acidification rapide des matières premières, de standardiser le procédé de fabrication en supplantant les fermentations naturelles et d'améliorer la qualité du produit fini (Leroy *et al.*, 2006). Les starters classiques sont des bactéries lactiques (BL) sélectionnées (lactobacilles homofermentaires et/ou pédiocoques) et des coques Gram positif, à catalase positive (CGC). Selon Hugas *et al.*, (1997), les ferments lactiques utilisés dans la fabrication des saucisses fermentées peuvent être classés en deux générations. La première génération comporte des bactéries lactiques d'origine végétale (*Lb. plantarum*, *Pe. pentosaceus*). La seconde génération comprend celles, d'origine animale, qui sont adaptées à l'écologie de la fermentation de la viande. Les *Lb. sake* et *Lb. curvatus* sont les bactéries lactiques les plus utilisées dans la deuxième génération des cultures starters.

Récemment, l'utilisation de nouveaux starters "fonctionnels", d'un grand intérêt industriel et nutritionnel a été mise au point par les chercheurs de l'Université de Bruxelles (2006). Les starters fonctionnels complètent les apports des starters classiques et concourent à l'amélioration et à l'optimisation du processus de fermentation et de la qualité des produits finis. Il s'agit des microorganismes permettant (1) de bio-conserver des aliments *via* la diminution de la charge microbienne totale ou pathogène du produit, sous l'effet des bactériocines ou des autres substances antimicrobiennes produites (Zdolec *et al.*, 2008 ; Albano *et al.*, 2007 ; Alves *et al.*, 2006 ; Ammor *et al.*, 2006 ; Ananou *et al.*, 2005a, 2005b ; Morisset *et al.*, 2005 ; Leroy *et al.*, 2003 ; Hammes *et al.*, 1998) ; (2) d'acquérir des avantages organoleptiques, technologiques ou nutritionnels par leurs propriétés protéolytiques et/ou lipolytiques, leur capacité de production des molécules health – promoting (le cas des cultures starters probiotiques), ... (Vuyst *et al.*, 2008; Pennacchia *et al.*, 2006, 2004 ; Moreno *et al.*, 2006 ; Leroy *et al.*, 2006, 2005, 2004, 2003, 2002 ; Erkkilä *et al.*, 2001a).

Les souches de starter classique sont choisies en se basant simplement sur leur capacité de production forte et rapide des acides organiques et leurs propriétés de formation des substances aromatiques (Antara *et al.*, 2004 ; Hughes *et al.*, 2002). Les souches de la flore autochtone sont plus prometteuses que celles venues des autres sources, en raison de leur adaptabilité au produit (Talon *et al.*, 2007). Dans le cas des starters fonctionnels, la sélection des souches s'appuie sur les critères plus exigeants et approfondis, telles que : la possibilité de formation de la couleur typique des salaisons sans utilisation des nitrites et nitrates (Zhang *et al.*, 2007), la capacité de production des substances health-promoting (des micronutriments et/ou des substances nutraceutiques,...)... (De Vuyst *et al.*, 2008 ; Leroy *et al.*, 2006). De plus, il est nécessaire de démontrer leur non-possibilité à synthétiser des amines biogènes et/ou leur absence de résistance aux antibiotiques (Ammor *et al.*, 2007 ; Latorre-Moratalla *et al.*, 2007 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Simonová *et al.*, 2006 ; Komprda *et al.*, 2004 ; González-Fernández *et al.*, 2003 ; Suzzi *et al.*, 2003 ; Ansorena *et al.*, 2002 ; Bozkurt *et al.*, 2002).

Concernant la formulation d'un starter classique, une utilisation concomitante des bactéries lactiques avec des *Micrococcaceae* améliore la qualité des produits carnés fermentés. L'utilisation des bactéries lactiques seules n'est pas suffisante pour obtenir un bon niveau de qualité organoleptique des produits finis. En effet, suite au développement des bactéries lactiques, la quantité d'acide lactique produit induit le goût acide, la fermeté et la cohésion de la texture des saucissons secs. Une contribution des *Staphylococcus* tels que *St. xylosus*, *St. carnosus*, *St. simulans* est nécessaire. Ces microorganismes sont capables de transformer les nitrates en nitrites et ainsi participer à la formation de substances nitroso- (nitrosomyoglobine ou nitrosohème), responsables de la couleur rouge – rosée typique de ces produits. Les conséquences bénéfiques de la croissance de ces starters non lactiques ont été citées dans de nombreuses études (Casaburi *et al.*, 2008 ; Essid *et al.*, 2007 ; Muthukumarasamy *et al.*, 2006 ; Pinto *et al.*, 2002 ; Hammes *et al.*, 1998 ; Hugas *et al.*, 1997).

2.3.2. Fonctions des ferments lactiques

Le champ d'application des bactéries lactiques est large et plusieurs de leurs propriétés sont importantes et influentes sur la qualité finale des produits alimentaires. Il permet d'assurer la qualité sensorielle des produits et de mieux maîtriser le processus de fermentation (Casaburi *et al.*, 2007 ; Muthukumarasamy *et al.*, 2006). Certaines souches présentent une activité antibactérienne et l'application de souches lactiques

bactériocinogéniques peut être considérée comme un outil complémentaire pour prévenir le développement des bactéries pathogènes (Todorov *et al.*, 2007 ; Dicks *et al.*, 2004 ; Nieto-Lozano *et al.*, 2002 ; Erkkilä *et al.*, 2001b).

2.3.2.1. Activité acidifiante

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Dans la fabrication des produits carnés fermentés, les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone et, par conséquent, de la chute du pH de la viande (Visessanguan *et al.*, 2006 ; Klingberg *et al.*, 2005 ; Papamanoli *et al.*, 2003 ; Bozkurt *et al.*, 2002 ; Hugas *et al.*, 1997). Cette acidification provoque la coagulation des protéines musculaires et induit ainsi la fermeté, la cohésion et le découpage facilité de la viande. En outre, l'accumulation des acides organiques produits inhibe la croissance des bactéries pathogènes et celle de la flore d'altération de la viande (Deumier *et al.*, 2003). Enfin, la maturation est favorisée quand la valeur du pH s'approche du point isoélectrique des protéines et le développement de la couleur est favorisé dans les conditions acides (Hugas *et al.*, 1997).

Dans la fermentation homolactique, l'acide lactique est le produit prépondérant (plus de 95%). Il provient de la réduction de l'acide pyruvique catalysée par la lactate déshydrogénase. Les lactobacilles (*Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*) et les pédiocoques (*Pe. pentosaceus*, *Pe. acidilactici*) sont les bactéries homolactiques prédominantes de la flore lactique naturelle des saucisses séchées fermentées. Parmi ces espèces, les *Lb. sakei* sont plus compétitives que les autres lactobacilles, manifestant une courte phase de latence, un fort taux de croissance et une concentration cellulaire finale plus importante (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Benito *et al.*, 2008 ; Fontán *et al.*, 2007 ; Baruzzi *et al.*, 2006 ; Ammor *et al.*, 2005 ; Papamanoli *et al.*, 2003). Les bactéries hétérolactiques possèdent le système glycéraldéhyde-P déshydrogénase, mais sont en général dépourvues des autres enzymes de la glycolyse et en particulier de fructose-6P kinase. Par contre, elles ont une phosphocétolase. Parmi les lactobacilles hétérolactiques, certains sont dits "obligatoires" : ils produisent 50% d'acide lactique à partir du glucose ; d'autres sont dits "facultatifs" : ils produisent 85% d'acide lactique. Les *Lb. brevis*, les *Leuconostoc* (*Le. carnosum*, *Le. mesenteroides*) et les *Weissella* (*We. viridescens*, *We. confusa*, ...) sont les bactéries hétérolactiques retrouvées dans les produits fermentés à base de la viande (Santos *et al.*, 2005 ; Rantsiou *et al.*, 2004 ; Papamanoli *et al.*, 2003). Les

autres bactéries hétérolactiques (*Lb. casei* ou *Lb. paracasei*) y sont, mais à une quantité moins importante (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Fadda *et al.*, 1998).

Dans la sélection des starters lactiques pour les produits carnés fermentés, les bactéries homolactiques sont généralement préférées aux hétérofermentaires. Ces dernières peuvent causer des défauts au niveau de la texture et/ou de la flaveur des saucisses séchées fermentées (les trous, le goût acide piquant) (Ammor *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2006 ; Buckenhüskes *et al.*, 1993). Cependant, pour certains produits, les bactéries hétérolactiques sont utilisées en tant que starters fonctionnels, par exemple : les *Lb. reuteri* (Muthukumarasamy *et al.*, 2006), les *Lb. casei* (Cenci-Goga *et al.*, 2008) ou les *Leuconostoc* (Papamanoli *et al.*, 2003).

Du fait de l'activité acidifiante, la dose d'adjonction des ferments lactiques dépend principalement de leur potentiel à se développer dans le produit cible. Pour la plupart des fermentations de saucisses du type européen par exemple, une valeur aux alentours de 10^6 UFC.g⁻¹ de la mêlée est recommandée pour les lactobacilles tandis que des quantités plus élevées (vers 10^8 UFC.g⁻¹ de la mêlée) sont conseillées dans le cas des *Lactococcus lactis* (Lücke, 2000).

2.3.2.2. Activité protéolytique

La fermentation, au cours de laquelle plusieurs transformations physiques, biochimiques et microbiologiques se déroulent, est une étape cruciale dans le processus de fabrication des saucisses fermentées.

En général, les bactéries lactiques ont une faible propriété protéolytique sur les protéines myofibrillaires. Toutefois, certaines souches de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. sakei* participent à l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques et par conséquent, contribuent à la décomposition des peptides en acides aminés (Drosinos *et al.*, 2007, Dalmış *et al.*, 2008 ; Scannell *et al.*, 2004 ; Larrouture *et al.*, 2000). Des peptidases issues de ces bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (Ammor *et al.*, 2005 ; Papamanoli *et al.*, 2003 ; Hughes *et al.*, 2002).

2.3.2.3. Activité lipolytique et formation de substances aromatiques

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés tels les jambons secs et les saucissons secs.

L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acide gras libre des produits fermentés, réduisant de ce fait la durée de leur maturation mais sans en améliorer systématiquement leur saveur (Zalacain *et al.*, 1996). Une odeur plus intense a été associée à une augmentation en acides acétique, butyrique et propionique après addition de lipases exogènes (Montel *et al.*, 1998).

Les recherches préliminaires sur les saucisses sèches fermentées ont démontré l'importance de la flore microbienne dans la lipolyse. En effet, il existe une coïncidence entre l'augmentation de la teneur en acides gras libres et la forte croissance des micro-organismes lipolytiques appartenant généralement au genre *Micrococcus* ou *Staphylococcus* (*St. xylosus* ou *St. carnosus*) (Montel *et al.*, 1998). Le genre *Lactobacillus* est faiblement lipolytique. Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur les activités estérasiques et lipolytiques des bactéries lactiques soient encore fragmentaires. Les lactocoques auraient une activité estérasique plus importante que les lactobacilles. Parmi les souches de lactobacilles thermophiles, les activités lipolytiques de *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* et *Lb. acidophilus* sont supérieures à celles de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Lb. helveticus*. Les souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs : *Lb. casei* et *Lb. plantarum*, possèdent un système estérasique plus actif que les hétérofermentaires strictes : *Lb. brevis* et *Lb. fermentum* (Talon *et al.*, 2000, 1994).

2.3.2.4. Production des substances inhibitrices

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les substances antimicrobiennes, est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire.

La sélection ou la production par génie génétique des souches hyperproductrices d'H₂O₂, agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, pourrait déboucher vers la biopréservation des aliments (Klaenhammer *et al.*, 1994).

L'acidité de la pâte de viande fermentée, suite de la formation des acides organiques, peut empêcher et même détruire la flore d'altération et de pathogènes des produits carnés fermentés. Sous la forme indissociée, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor *et al.*, 2007 ; Deumier *et al.*, 2003). Du point de vue sensoriel, seules de faibles concentrations en acide acétique sont acceptables dans les produits carnés. Cependant, l'effet antimicrobien de celui-ci n'est pas négligeable car pour une même concentration et pour un pH identique, il est plus efficace que l'acide lactique. La sensibilité à ces acides dépend des bactéries et de l'action simultanée d'autres facteurs tels que : l'activité de l'eau et la présence ou non des nitrites (Lücke, 2000).

De nombreuses publications font état de production des bactériocines par les bactéries lactiques. Ces composés inhibent *in vivo* la croissance des germes pathogènes rencontrés dans les industries agro-alimentaires. Les bactériocines telles que la plantacine (produite de *Lb. plantarum*), la curvacine (de *Lb. curvatus*), la leucocine (de *Leuconostoc*), la pediocine (de *Pediococcus acidilactici*) ou la nisine (de *Lactococcus*) ont démontré leur efficacité vis-à-vis des *Listeria monocytogenes*, *Li. innocua*, *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium* ssp (Albano *et al.*, 2007 ; Todorov *et al.*, 2007 ; ; Drosinos *et al.*, 2006b ; Dicks *et al.*, 2004 ; Työppönen *et al.*, 2003 ; Nieto-Lozano *et al.*, 2002 ; Scannel *et al.*, 2001 ; Aymerich *et al.*, 2000). L'utilisation des ferments producteurs de bactériocines a également été étudiée. Dans le domaine des produits carnés, la nisine demeure la seule bactériocine utilisée industriellement et elle reste souvent l'outil de choix pour une action préservatrice "naturelle" (Topisirovic *et al.*, 2006 ; Morisset *et al.*, 2005).

2.3.2.5. Formation des exopolysaccharides

La plupart des microorganismes synthétisent les polysaccharides. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule. D'autres sont des composants de la paroi. Un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le terme "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire". Deux types d'EPS, soit excrété dans le milieu environnant, soit lié à la surface de la cellule sous forme de capsule, peuvent être produits par certaines bactéries lactiques (Ai *et al.*, 2008 ; Canquil *et al.*, 2007 ; Topisirovic *et al.*, 2006 ; Walling *et al.*, 2005 ; Macedo *et al.*, 2002). D'après Lin et ses collaborateurs (2007), la production des EPS dépend des bactéries lactiques et de la

durée de la fermentation. La production du glucane par *Lactococcus lactis* et la production d'un hétéropolysaccharide par les *Lactobacillus curvatus* sont rapportées par Van der Meulen *et al.* (2007).

Les travaux sur les polysaccharides bactériens, leur rôle et les conséquences de leur existence ont été d'abord réalisés en recherche médicale. A l'heure actuelle, l'utilisation des EPS couvre de vastes domaines qui vont de l'industrie alimentaire (en particulier les produits laitiers) et pharmaceutique, à la récupération assistée du pétrole.

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des EPS joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Welman *et al.*, 2003 ; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (Durlu-Özkaya *et al.*, 2007 ; Amatayakul *et al.*, 2006). L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005).

Donc, les bactéries lactiques possèdent d'innombrables propriétés recherchées dans la fabrication des produits carnés fermentés comme les saucissons secs, les saucisses séchées fermentées,... Durant les deux dernières décennies, beaucoup d'intérêts se sont portés sur la physiologie et la génétique des espèces lactiques d'origine carnée. La sélection des souches lactiques starters commence par l'étude de leurs caractéristiques pour atteindre les objectifs visés.

Chapitre 3. EVALUATION SENSORIELLE DES PRODUITS ALIMENTAIRES

3.1. Généralités

Le comportement des consommateurs vis-à-vis des aliments est toujours une démarche complexe. Le choix des produits alimentaires est subjectif et dépend de nombreux critères : mode de vie, habitudes ethniques, sociales, histoires personnelles, budget disponible... Dans tous les cas, les clients demandent d'être satisfaits dans leurs besoins alimentaires et ils y attachent une très grande importance.

L'alimentation représente un impact économique important et les entreprises sont très désireuses de connaître les choix alimentaires de leurs chers clients afin d'être capable de leur proposer les aliments qu'ils préfèrent et donc qu'ils achèteront. En plus, les grandes distributions ont besoin de s'assurer que leurs propres produits commercialisés ont des caractéristiques spécialement différentes (ou ressemblantes) à des produits leaders.

L'évaluation sensorielle est la technique qui cherche à appréhender des sensations aperçues dans l'approche d'un produit alimentaire. Au cours de ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés en science sensorielle. De nouvelles techniques se développent (Ares *et al.*, 2008 ; Etaio *et al.*, 2008 ; Giménez *et al.*, 2008 ; Bovell-Benjamin *et al.*, 2003 ; Stoer *et al.*, 2002 ; Koferli *et al.*, 1998 ; Gay *et al.*, 1992) et de nouvelles méthodes d'analyses des données obtenues sont appliquées (Le *et al.*, 2008 ; Morand *et al.*, 2006). Le domaine d'application s'est étendu à des professions autres que celles de l'agroalimentaire ; il concerne aujourd'hui la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie, les produits d'hygiène, les emballages, les tissus, la mécanique, l'ameublement, la publicité, ...

En général, le domaine d'évaluation sensorielle occupe deux secteurs : l'analyse sensorielle et l'évaluation hédonique.

L'analyse sensorielle cherche à déterminer les propriétés organoleptiques des aliments. Le but est de connaître les effets sensoriels distincts des différents constituants du produit. On distingue, classiquement, deux grandes catégories d'épreuves : les épreuves discriminatives et les épreuves descriptives. Pour les premières, l'objectif est de déterminer, de préciser la nature et l'intensité des différences observées entre plusieurs produits à partir de "descripteurs". Pour les secondes, le but est de mettre en évidence les ressemblances et différences entre produits sous forme de cartes sensorielles.

Dans l'évaluation sensorielle, on cherche à connaître les préférences ou les rejets entraînés par les propriétés organoleptiques de l'aliment ; il est caractérisé par l'expression d'évaluation hédonique. Cette distinction est fondamentale : l'analyse sensorielle s'intéresse au produit pour lui-même, alors que l'analyse hédonique s'intéresse à la manière dont un produit est accepté par un groupe cible de consommateurs. Les deux approches sont complémentaires en évaluation sensorielle. Elles ont en commun un certain nombre de bases chimiques, physiologiques, psychologiques et l'interprétation des résultats repose sur une statistique appropriée.

L'objectif de la métrologie sensorielle est de mettre en œuvre des instruments et des méthodes visant à définir quantitativement la relation stimulus-réponse chez un sujet, ceci afin d'évaluer les caractéristiques organoleptiques (goût, odeur, apparence, texture et couleur) d'un produit. L'analyse sensorielle permet de décrire et de quantifier, de manière systématique, l'ensemble des perceptions humaines. L'évaluation hédonique vise à mieux cerner les perceptions et les évaluations subjectives du consommateur. Dans le domaine d'évaluation sensorielle, l'homme joue le rôle nucléaire. En effet, l'être humain est le seul à pouvoir rendre compte de manière verbale d'une perception sensorielle.

La réalisation d'une mesure sensorielle doit se faire dans un milieu où les influences extérieures sur les dégustateurs sont limitées. Le choix d'une épreuve ou d'une autre dépend du but recherché. Les individus requis pour effectuer des évaluations sensorielles forment des ensembles qu'on appelle *panel*. Il existe deux catégories de panel : sujets experts et panel des consommateurs. Les échantillons sont présentés de façon anonyme et homogène. Leur préparation nécessite une grande rigueur. Enfin, pour éviter l'influence de l'ordre avec lequel le sujet déguste les produits et qui peut agir sur ses réponses, il faut changer cet ordre d'un sujet à l'autre et d'une répétition à l'autre pour un même sujet.

3.2. Epreuves d'évaluation sensorielle

En réalité, plusieurs méthodes d'évaluation sensorielle sont appliquées afin de qualifier et quantifier les produits alimentaires. Il existe des normes internationales (ISO), nationales (AFNOR de la France, TCVN du Vietnam,...)... Comportant les spécifications et les méthodes d'analyse, elles sont des documents de référence du secteur alimentaire.

3.2.1. Méthode de notation du Vietnam (TCVN 3215 – 79)

Depuis 1979, la norme TCVN 3215-79 est officiellement appliquée en alimentaire au Vietnam. Elle permet de décrire les caractères sensoriels des produits alimentaires, de les comparer et de les classer en fonction de leur qualité organoleptique.

Dans cette méthode, la qualité sensorielle d'un aliment est examinée en fonction de quatre aspects principaux (apparence et couleur extérieure du produit, texture et couleur intérieure, goût et odeur).

Le jury de dégustateurs se compose de 5 à 7 sujets experts. Ces panelistes sont entraînés pour bien comprendre les caractéristiques sensorielles du produit visé. En séance d'évaluation, les dégustateurs donnent une note variant de 0 à 5 pour chacun de quatre caractères organoleptiques étudiés. La note 0 correspond à la plus mauvaise évaluation ; dans ce cas l'aliment est considéré comme immangeable. La note 5 représente un produit sans défaut. La note 3 donne une évaluation moyenne des caractères sensoriels étudiés. La note dite "ajustée" est ensuite calculée en multipliant la note obtenue avec le coefficient d'importance correspondant à chaque caractère. Ces coefficients représentent l'importance des caractères examinés dans l'ensemble de la qualité sensorielle. Il existe des coefficients d'importance publiés légalement pour une vingtaine de types d'aliments (norme TCVN 6063 : 1995 pour la bière, par exemple). Pour ceux qui manquent, leur construction peut se faire à la fin de la phase d'entraînement du panel. La note finale de la qualité sensorielle du produit est le total de ces quatre notes calculées. Le classement des produits examinés s'effectue en fonction de la note finale des produits (Tableau₍₁₎ IV).

**Tableau⁽¹⁾ IV – Echelle de classement des produits alimentaires
selon leur qualité sensorielle (Norme TCVN 3215 – 79)**

Classe	Note de la qualité sensorielle
Excellente	18,6 – 20,0
Bonne	15,2 – 18,5
Moyenne	11,2 – 15,1
Faible	7,2 – 11,1
Mauvaise	4,0 – 7,1
Médiocre	0,0 – 3,9

3.2.2. Epreuves discriminatives

Les épreuves discriminatives visent à détecter la présence ou l'absence de différences sensorielles entre deux produits. Ces méthodes sont simples à réaliser et à interpréter : les sujets perçoivent ou ne perçoivent pas de différence dans les propriétés sensorielles. Cependant, elles ne permettent ni d'identifier ni de quantifier les différences.

Les plus utilisées de ces épreuves sont le test "triangulaires" et le test "A et non A. On imposera parfois des épreuves à choix forcé où les dégustateurs doivent obligatoirement donner une réponse. La non-réponse constituerait une solution de facilité pour les sujets, tandis que les différences sont inévitablement peu importantes.

Les épreuves discriminatives présentent de nombreux avantages. Néanmoins, il faut respecter certaines précautions liées à la présentation des échantillons pour éviter les fausses réponses (parfaite homogénéité des échantillons, par exemple) (Nicod *et al.*, 2003). Le nombre de dégustateurs requis dépend du risque de seconde espèce (risque β) que l'expérimentateur accepte de prendre et un groupe d'une vingtaine d'individus est tout à fait adapté dans la pratique. Les sujets peuvent être peu entraînés, quelques séances seulement pour les habituer au produit, mais ils doivent faire preuve d'une grande capacité à détecter de faibles différences entre les échantillons. Le traitement des résultats est fondé sur l'utilisation de la loi binomiale ou sur le calcul de χ^2 (Meilgaard *et al.*, 2006 ; Nicod *et al.*, 2003 ; Lawless *et al.*, 1998).

3.2.3. Epreuve de classement par rangs

L'épreuve de classe par rang consiste à ranger des échantillons par ordre croissant ou décroissant sur un critère descriptif ou sur la préférence hédonique (ISO 8587:2006).

Le nombre et la qualité des membres du jury dépendent du but de l'expérience. Pour évaluer des critères descriptifs (étude de l'influence des matières premières sur l'intensité de la couleur du produit, par exemple), un jury de 12 à 15 experts est exigé. Concernant la détermination de l'ordre de préférence dans le test hédonique, le nombre minimal des dégustateurs est de 60 personnes pour chaque groupe type de consommateur.

L'ordre d'évaluation influence considérablement les réponses des dégustateurs (Strigler *et al.*, 2003). Par conséquent, il est indispensable d'indiquer clairement l'ordre à suivre sur le questionnaire. Dans le cas où plusieurs échantillons sont comparés, le plan de présentation en blocs incomplets équilibrés est proposé. Chaque sujet reçoit seulement une partie de p produits. L'expérimentateur s'arrange pour que : (1) chaque sujet reçoive le même nombre (k) de produits, (2) chaque produit soit dégusté le même nombre de fois (r), (3) tous les couples de produits soient dégustés le même nombre de fois (λ). Dans la pratique, il existe des tables qui préciseront à la fois les plans existants et la manière de les construire.

Les dégustateurs évaluent les échantillons en suivant l'ordre de présentation et les rangent en fonction de l'attribut désigné. Le test de Friedman est proposé pour interpréter les données de comparaison obtenues (ISO 8587:2006).

3.2.4. Epreuves descriptives (ou méthode de profil sensoriel)

La méthode de profil sensoriel est fréquemment utilisée pour décrire et évaluer les produits alimentaires. Elle fournit plus de renseignements sur les produits par rapport aux études précédentes. De plus, le profil sensoriel permet de comparer entre différents produits et de préciser la nature de leurs différences. Dans ce secteur, quatre méthodes différentes sont appliquées : le profil de saveurs, la méthode d'analyse descriptive quantitative ou QDA (Quantitative Descriptive Analyse), la méthode d'analyse descriptive dite Spectrum et le profil flash.

Quelle que soit la méthode utilisée pour évaluer des produits, la construction d'un profil sensoriel du produit comprend un certain nombre d'étapes clés :

- (1) Création de la liste des descripteurs sensoriels par le panel : cet outil d'évaluation peut être imposé aux sujets (profil conventionnel) ou chaque sujet est libre de noter les descripteurs de son choix (profil libre-choix). Dans le dernier cas, une discussion entre les membres du groupe est nécessaire pour réduire les doubles ou les termes inutiles.
- (2) Entraînement : l'objectif est d'obtenir un jury qui peut atteindre au consensus et à la répétabilité dans l'évaluation sensorielle des produits. Un jury entraîné est capable de détecter les caractères sensoriels des produits, de les différencier et de verbaliser les propriétés d'un produit d'une manière répétable.

Il est difficile d'estimer le temps nécessaire d'entraînement du jury. Certaines méthodes de profils sensoriels demandent un temps d'entraînement assez long : par exemple la méthode Spectrum (Munoz *et al.*, 1992) recommande de 60 à 80 heures d'entraînement par modalité sensorielle, le profil de texture (Munoz *et al.*, 1992) préconise de 90 à 100 heures et le profil de saveurs (Keane, 1992) requiert six mois d'entraînement quotidien. Toutefois, d'autres méthodes conseillent une durée d'entraînement plus faible. Par exemple, l'analyse "Quantitative descriptive" (Stone *et al.*, 2004) ne demandent que huit à dix séances d'entraînement étalées sur deux semaines. Suivant la même idée, Labbe *et al.*, (2004) suggère un court entraînement d'une quinzaine d'heures. D'après Chollet *et al.* (2005), avec une telle durée, l'entraînement permet de développer la capacité à détecter une propriété organoleptique spécifique dans une matrice complexe et d'augmenter le consensus entre les juges dans des tâches perceptives et verbales. Cependant, un entraînement plus long semble souhaitable afin de faciliter la perception et la communication des panelistes.

- (3) Evaluation : le but est d'obtenir une description quantitative répétable d'un ensemble de produits. Lors de l'évaluation, les échantillons peuvent être présentés simultanément ou à la façon monadique. La présentation simultanée des produits est très intéressante dans le cas où l'on recherche les différences entre ces derniers (Strigler *et al.*, 2003). L'intensité des descripteurs est évaluée *via* l'échelle d'intensité. Deux types d'échelle peuvent être utilisés : l'échelle structurée et l'échelle non structurée. En général, elle va de zéro à une valeur positive et son étendue est telle qu'elle couvre tous les cas de figures rencontrés sans distorsion.

(4) Traitement des données : ce travail se fait d'abord pour chacun des descripteurs évalués. Les produits sont donc comparés caractéristique par caractéristique. Le choix d'un test statistique dépend de l'échelle de cotation utilisée, du nombre des échantillons examinés et de la procédure expérimentale. La représentation graphique permet de visualiser les caractéristiques des produits. La superposition des profils sensoriels permet d'apercevoir les différences entre les produits étudiés.

De plus, on cherche à définir une configuration multidimensionnelle des produits qui réalise un compromis entre les configurations individuelles. Les premières composantes principales de ce compromis sont utilisées pour dresser une carte sensorielle des produits et pour relier les aspects sensoriels aux caractéristiques physico-chimiques des produits ainsi qu'aux préférences des consommateurs auprès de ces produits.

3.2.5. Epreuves hédoniques (test de consommateurs)

Les épreuves hédoniques visent à percevoir l'acceptabilité d'un produit par les consommateurs ou leur préférence entre différents produits testés. En IAA, elles sont considérées comme un outil puissant pour mieux appréhender les attentes des consommateurs. Intervenant à tous les niveaux de la vie d'un produit (sa conception, son suivi et son actualisation), cette approche est généralement utilisée pour comparer celui-ci avec les produits concurrentiels et permet donc de mettre au point les innovations technologiques.

En général, il existe deux types de tests hédoniques : (1) le test d'acceptation, dans lequel les produits sont présentés individuellement au dégustateur qui doit exprimer son avis, sur une échelle de cotation de 9 points ou sur une échelle d'intervalle (Köster *et al.*, 2003a) ; (2) le test de préférence où le dégustateur doit choisir un produit préféré parmi ceux évalués ou les ranger par ordre croissant ou décroissant de ses préférences. Quand le nombre de produits ou leur nature rend impraticable leur classement, la procédure en blocs incomplets équilibrés peut être utilisée (Lawless *et al.*, 1998).

Cette méthode s'adapte aussi bien avec des sujets natifs qui n'ont jamais participé à une analyse sensorielle, qu'avec des sujets qui sont déjà habitués à ce type d'évaluation. Un nombre de dégustateurs (supérieur à 36 personnes) est demandé pour chaque population ciblée (Köster *et al.*, 2003b).

Dans le secteur de viande, plusieurs d'études de consommateurs sur la viande de bœuf (Huffman *et al.*, 2008 ; Lagerstedt *et al.*, 2008 ;), de mouton (Bernabéu *et al.*, 2005) ou de porc (Brewer *et al.*, 2001) ont été publiées. Au début, les recherches ont été faites sur un petit échantillon de personnes et avec une simple variation [par exemple, l'étude de l'influence du gras intramusculaire sur l'intention d'achat des consommateurs (Brewer *et al.*, 2001)]. Récemment, les études de consommateurs sont réalisées sur de larges panels et avec de multi-variations (Diez *et al.*, 2006 ; Resurreccion *et al.*, 2004 ; Bryhni *et al.*, 2003). Ces études permettent d'appréhender le comportement des consommateurs vis-à-vis des variations dans la qualité sensorielle des produits et ainsi d'arriver à mieux connaître des multi-facteurs qui dirigent le choix d'achat des consommateurs, de planifier des stratégies et aussi envisager des perspectives intéressantes pour la production de la viande et de ses dérivés (Sveinsdóttir *et al.*, 2008 ; Aaslyng *et al.*, 2007).

Partie II

MATERIELS ET METHODES