



Durant les trois dernières décennies, l'industrie de la viande fraîche a beaucoup changé ainsi que le comportement des consommateurs. Ces derniers attendent que la viande et les produits à base de viande qui leur sont proposés répondent à trois critères :

- Conformité dans leur composition par rapport à la réglementation.
- Respect des critères microbiologiques en vigueur.
- Bonnes qualités organoleptiques.

Par ailleurs, les contraintes microbiologiques strictes sont de plus en plus renforcées, notamment pour les viandes hachées (dont la consommation annuelle en France est d'environ 400 000 tonnes). Face à ces contraintes et à la refonte des dispositifs réglementaires, le secteur artisanal doit anticiper au risque de se voir imposer des critères sévères (germes pathogènes ou d'altération).

Dans ce contexte, les professionnels souhaitent compléter les connaissances relatives à la qualité microbiologique et biochimique de leurs produits afin de disposer d'informations supplémentaires sur les viandes hachées artisanales. L'objectif premier de cette étude est de :

- déterminer la réalité actuelle de la contamination initiale de la viande hachée artisanale et de sa qualité biochimique,
- situer ces viandes artisanales en terme de DLC, par le biais des challenges tests (*Listeria monocytogenes*).

## Viande hachée artisanale

# Qualité, DLC et challenges tests

**Que ce soit sur le plan bactériologique ou biochimique les viandes hachées artisanales sont en général de bonne qualité. Cependant les taux de contamination, notamment par *L. monocytogenes* sont étroitement liés aux conditions de stockage et en tout premier lieu à la chaîne du froid qui doit être parfaitement maîtrisée.**

CHRISTIEANS S.

ADIV  
2, rue Chappe  
63039 Clermont Ferrand Cedex 2

Science et technique

## PROTOCOLE

### Étape 1: Contamination initiale et qualité biochimique des viandes hachées artisanales

#### Prélèvements

Pour cette première partie de l'étude, les prélèvements ont été concentrés dans deux régions : la région Auvergne et la région parisienne. Pour chaque région, l'étude a été réalisée en partenariat avec 10 bouchers artisans. Par atelier, environ 15 steaks hachés ont été prélevés. Afin de garantir la fiabilité des analyses, les échantillons ont été collectés de façon aseptique, mis dans des sacs Stomacher stériles, transportés dans des glacières isothermes à 4 °C, puis analysés dans les 24 h.

#### Les analyses microbiologiques

Pour chaque boucher artisan, 10 steaks hachés ont fait l'objet d'analyses microbiologiques : 5 échantillons ont été analysés à J0 (le jour de la préparation et du prélèvement). Les 5 autres ont été stockés pendant 4 jours selon la norme NF V01 003 (1/3 du temps à 4 °C puis 2/3 du temps à 8 °C) et ensuite analysés à J4. Chaque échantillon (n = 5) a fait l'objet d'une analyse individuelle complète. Pour chaque steak, les analyses résumées dans le tableau ci-dessous ont été réalisées à partir d'un prélèvement cœur + surface.

Analyses	Méthodes employées
Matière sèche	NF V04-401
Humidité	NF V04-401
Lipides libres	NF V04-403
Protéines	NF V04-407
Collagène	NF V04-415
Collagène/protéines	NF V46-002

Germes analysés	Méthodes employées
Fllore totale (ou micro-organismes aérobies 30 °C)	NF V08-051
<i>Pseudomonas</i>	NF V04-504
Entérobactéries	NF V08-054
<i>E. coli</i>	NF V08-053
<i>S. aureus</i>	NF V08-057-1
Recherche de salmonelle	Test SRT (Oxoid), NF V08-052
Recherche <i>Listeria</i>	NF V08-055

#### Les analyses physico-chimiques

Afin de déterminer la qualité biochimique des viandes hachées artisanales, 5 steaks ont été analysés à J0 (jour de fabrication et de prélèvement). Pour chaque échantillon, les analyses réalisées apparaissent dans le tableau ci-dessous :

#### Traitements statistiques

Dans un premier temps, les résultats obtenus à J0 ont été comparés avec les prescriptions réglementaires et normatives des viandes hachées. Puis dans un deuxième temps, les données ont été traitées avec le logiciel Statview dans le but de mettre en évidence les flores qui présentent des variations significatives en fonction du site de prélèvement, de la région de prélèvement et de la durée de stockage.

### Étape 2: Tests de croissance (challenges tests)

#### Viandes

Comme le préconise l'Afssa, les challenges tests ont été réalisés sur des échantillons provenant de trois lots différents et à raison de trois répétitions. Pour cette deuxième étape, les prélèvements sur viandes hachées ont été effectués chez trois bouchers de la même région, transportés dans des glacières isothermes (à 4 °C) puis acheminés au laboratoire P2+ de l'Adiv pour lesensemencements artificiels.

#### Origine des souches de *L. monocytogenes*

Sur la base des lignes directrices de l'avis de l'Afssa, pour les trois lots, deux souches ont été employées dans cette étude. La souche de référence CIP 78.38 (sérovar 4b, de l'Institut Pasteur) et une souche de terrain. Cette dernière est une souche provenant de viande hachée industrielle, isolée dans le cadre d'un autre programme.

#### Préparation des *inoculum*, taux et modes d'ensemencements

Les souches sont conservées congelées à -20 °C. Avant les manipulations, elles sont décongelées, puis entraînées par trois repiquages successifs dans le bouillon Trypticase Soja à 37 °C. Vingt-quatre heures avant la réalisation des tests de croissance, les bactéries sont ensemencées dans des Erlenmeyer de 250 mL et laissées en agitation pendant 12 à 18 h, jusqu'au début de la phase stationnaire. Les calculs sont ensuite effectués de façon à obtenir le taux d'ensemencement de l'ordre de 10<sup>3</sup> germes/g de produit.

Les manipulations ont été réalisées séparément pour chaque souche de *L. monocytogenes*, à raison de 3 répétitions par lot, avec une inoculation en surface et en profondeur (en se rapprochant le plus possible des conditions naturelles de contamination).

#### Conditions et durée de conservation des échantillons

Comme l'indique la note de l'Afssa, les modalités de conservation permettent de distinguer un test de phase 1 et un test de phase 2. Le premier est réalisé à une température de 30 °C, donc dans des conditions très éloignées de la réalité pratiquée. Le test correspondant à la phase 2 doit tenir compte des obligations réglementaires et des conditions proches de la réalité selon les modes de distribution, transport, consommation finale.

Dans la présente étude, le test de phase 1 étant très éloigné de la réalité, nous sommes directement intéressés au test de phase 2. Les différents échantillons de viandes hachées témoins ou ensemencés ont été conditionnés dans des barquettes sous film étirable, puis stockés à deux températures différentes selon deux modalités :

- en régime statique à 2 températures distinctes : 0 à 4 °C, température correspondant à celle de la réglementation, (2 °C) et simulant une chaîne de froid bien maîtrisée et 7 à 8 °C correspondant à la température de frigos ménagers (voire une chaîne de froid mal maîtrisée),
- selon la norme Afnor NF V01 003 : avec 1/3 du temps à 4 °C et 2/3 du temps à 8 °C.

Ces différentes modalités de température de stockage permettront de faire des extrapolations à d'autres cas de figure et fourniront des données pour des études de courbes de croissance ou de la microbiologie prédictive.

#### Analyses et dénombrement

L'analyse des différents échantillons inoculés et témoins a été effectuée à J0 (vérification du taux de départ), J1 et J4. Le dénombrement de *L. monocytogenes* a été effectué selon la norme NF EN ISO 11 290-2 et une confirmation de la souche *L. monocytogenes* a été réalisée par isolement sur gélose spécifique (gélose Aloa) et par un test biochimique (monoconfirm test).

#### Traitement des données

Afin d'avoir une répétitivité des résultats et de dégager les résultats les plus significatifs, pour chaque essai, trois répétitions ont été réalisées et des traitements statistiques effectués avec Statview (test ANOVA) ont permis de comparer les variances et les moyennes obtenues avec les différents protocoles de stockage.

## CONTAMINATION INITIALE ET QUALITÉ BIOCHIMIQUE DES VIANDES HACHÉES ARTISANALES

Les résultats de la première étape ont montré que sur le plan bactériologique, les viandes hachées artisanales présentent une bonne qualité. En effet, sur la quasi totalité des produits analysés, nous avons noté une absence de micro-organismes pathogènes (*Listeria*, *Salmonelle* et *Staphylococcus aureus*), ainsi que des dénombrements inférieurs au seuil de détection (< 10 germes/g de produit) pour *E. coli* et ASR. Ces résultats se sont maintenus pendant 4 jours de stockage des produits. Par contre, à J0 la flore totale, les *Pseudomonas* et les Entérobactéries étaient présents à des taux non négligeables dans ces produits et leurs taux ont tendance à augmenter rapidement pendant la durée du stockage. En effet, la figure 1 montre l'évolution de la flore totale mésophile dans les différents produits analysés dans une région donnée. On constate que cette flore est assez élevée dès le premier jour de prélèvement (J0). Elle est en moyenne de l'ordre de  $10^6$  germes/g, dans les deux régions puis sa concentration augmente de façon régulière pendant la durée du stockage. Cette évolution d'environ 1 à 1,5 log selon la région confirme la fragilité microbiologique de la viande hachée, qui est en effet une matrice propice au développement bactérien.

Les *Pseudomonas* sont les germes psychrotrophes majoritaires dans les viandes et représentent une bonne partie de la flore totale (figure 2). Leur population de départ est d'environ  $10^{5,6}$  germes/g, puis leur taux évolue au cours du stockage des échantillons. Au bout de 4 jours de conservation, on atteint des concentrations d'environ  $10^7$  germes/g de produit, représentant ainsi la quasi totalité de la flore totale de la viande hachée.

Comme pour les *Pseudomonas*, le taux des entérobactéries évolue de façon linéaire et similaire dans les différents produits issus des 2 régions (figure 3).

L'analyse des différents échantillons pris séparément par boucher montre qu'il existe une variabilité entre bouchers au sein d'une même région. En effet, certains échantillons semblent être beaucoup plus chargés en flore totale, en *Pseudomonas* et/ou en entérobactéries (exemple des *Pseudomonas* dans la figure 4). Ce résultat est probablement en corrélation avec la qualité de la matière première employée pour la fabrication des steaks hachés.

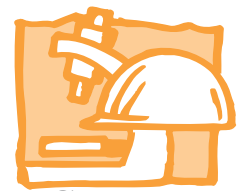
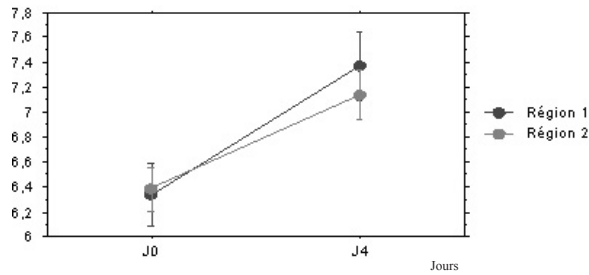
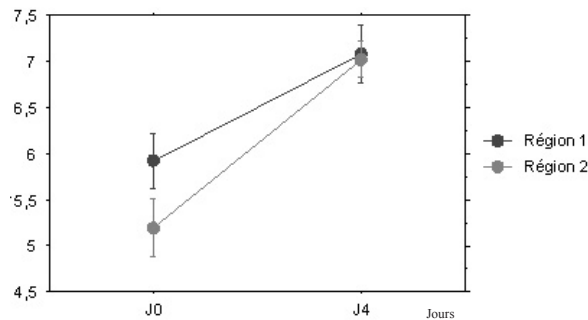


Figure 1 : UNE FLORE TOTALE INITIALEMENT ÉLEVÉE



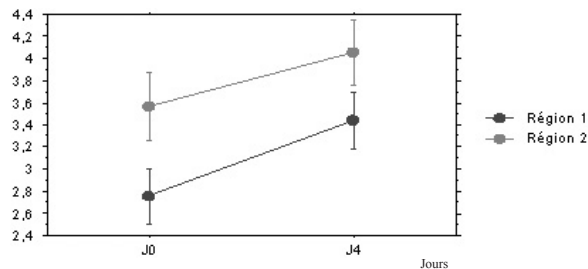
Évolution de la flore totale au cours de la conservation, des différents produits analysés dans une région donnée

Figure 2 : LE TAUX DE *PSEUDOMONAS* ÉVOLUE RAPIDEMENT



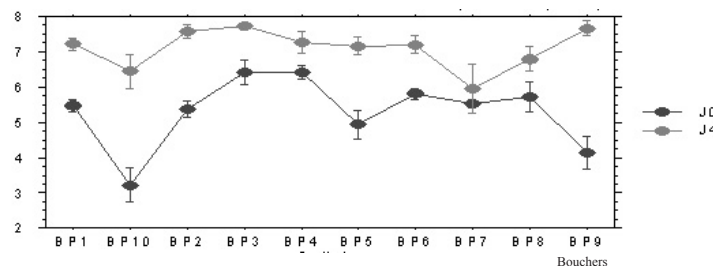
Évolution des *Pseudomonas* au cours de la conservation, des différents produits analysés dans une région donnée

Figure 3 : ÉVOLUTION LINÉAIRE DES ENTÉROBACTÉRIES



Évolution des entérobactéries au cours de la conservation, des différents produits analysés dans une région donnée

Figure 4 : UNE CONTAMINATION VARIABLE AU SEIN D'UNE MÊME RÉGION



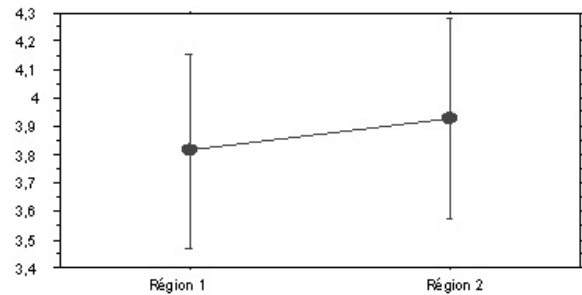
Évolution de la population des *Pseudomonas* par boucher artisan et au cours du temps de conservation dans la région 2

Il est possible que les résultats obtenus pour ces trois flores soient liés à la durée de maturation qui est plus importante chez les bouchers artisans. Cependant, il serait nécessaire pour ces derniers de mettre en place des actions qui puissent leur permettre de diminuer la charge initiale en flore totale et *Pseudomonas*. En effet, si de tels produits doivent répondre aux critères réglementaires, ils peuvent être classés « non satisfaisants », uniquement à cause de la flore totale.

D'un point de vue biochimique, les viandes hachées artisanales peuvent être également qualifiées de qualité supérieure, avec un taux du rapport collagène/protéines faible, une très faible teneur en matière grasse et surtout des teneurs en protéines élevées.

Les résultats du rapport collagène/protéine apparaissent dans la figure 5 où on constate que ce rapport est quasiment identique dans les deux régions étudiées et qu'il se situe aux environs de 3,9 %. Ce rapport est très faible en comparaison avec le maximum autorisé par le code des usages des viandes hachées industrielles (10 %) ou avec celui de la norme NF V46-002, qui, elle autorise un maximum de 12 %. Ce faible rapport, bien qu'il permette de qualifier les produits analysés de qualité supérieure, peut poser des problèmes quand à la jutosité et la liaison des produits. Ce résultat peut s'expliquer par le parage des muscles et par la nature des muscles employés. Une enquête menée auprès des bouchers ayant participé à l'étude, a montré que la nature des muscles utilisés pour la fabrication des steaks est variable. En effet, la quasi totalité des bouchers questionnés utilise pour la fabrication un mélange de deux ou trois muscles. Le muscle gîte à la noix est commun, presque à tous les artisans, et l'utilisation des autres muscles est variable d'un atelier à un autre. On trouve ainsi un ou deux parmi les muscles suivants : jumeau, collier, épaule plat de côte, dessus de côte, aiguillette d'épaule, rond de gîte, macreuse, paleron... etc. Cette variabilité de la nature du muscle employé est clairement corrélée aux résultats de la figure 6 où le rapport Col/P représenté par boucher dans une région donnée (moyenne de 5 répétitions) montre une variabilité d'un artisan boucher à un autre, avec des valeurs qui oscillent entre 2,4 % et 6,2 %

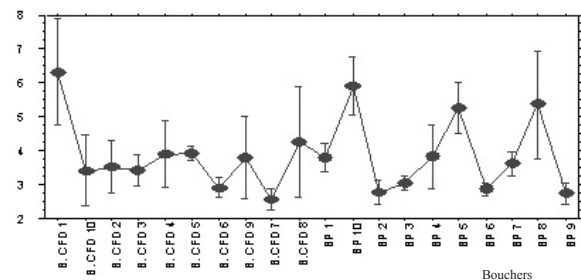
**Figure 5 : LE RAPPORT COLLAGÈNE/PROTÉINES EST FAIBLE**



Résultats du rapport Col/P pour la totalité des échantillons analysés, issus d'une région donnée

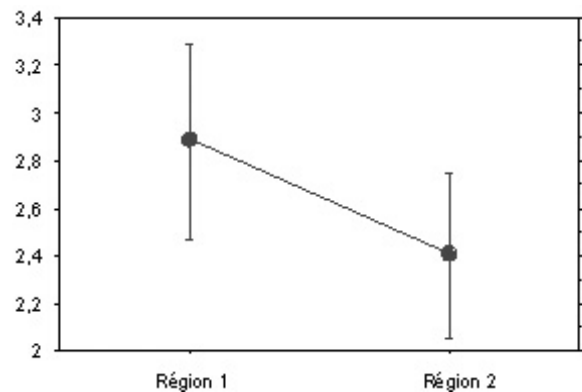
Pour tous les échantillons collectés

**Figure 6 : LE RAPPORT COL/P DÉPEND DES MUSCLES UTILISÉS**

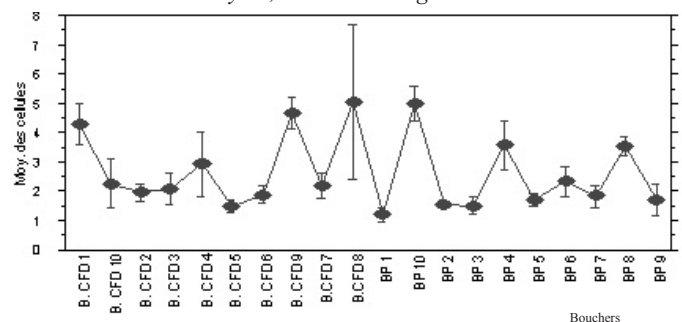


Résultats du rapport Col/P par boucher artisan dans une région donnée

**Figures 7 et 8 : ÉVOLUTION LINÉAIRE DES ENTÉROBACTÉRIES**



Résultats de la teneur en matière grasse pour la totalité des échantillons analysés, issus d'une région donnée



Résultats de la teneur en matière grasse par boucher artisan dans une région donnée

dans une région donnée, la teneur en matière grasse pour chaque boucher et pour la totalité des échantillons analysés pour une région donnée apparaît dans les figures 7 et 8. La teneur en matière grasse est variable d'un boucher à un autre et même d'une région à une autre. En effet, dans la région 1, cette teneur est proche de 3 %, alors qu'elle est autour de 2,4 % pour l'autre région. Cette teneur en matière grasse est très faible et peut poser des problèmes organoleptiques des viandes hachées artisanales car de telles teneurs peuvent entraîner des problèmes de flaveur et de moelleux des produits.

Comme pour le critère Col/P, cette faible teneur en matière grasse est probablement en relation avec le parage et la nature des muscles employés. La figure 10 montre en effet que le taux de matière grasse varie entre 2 % et 5 %. Enfin, la teneur en protéine représentée dans la figure 9 montre que la totalité

des échantillons analysés affiche une teneur élevée, qui varie entre 22,2 % et 22,8 %. Ce résultat similaire entre les deux régions et pour tous les produits analysés témoigne de la qualité nutritionnelle des viandes hachées artisanales. En effet, les analyses de routine au laboratoire des viandes hachées industrielles montrent des teneurs moyennes en protéines de l'ordre de 18 à 19 %, pour des produits à 15 % de matière grasse. Cette teneur est quasiment identique pour tous les échantillons analysés pour un boucher artisan donné.

## ÉTAPE 2: TESTS DE CROISSANCE (CHALLENGES TESTS)

Les résultats obtenus (moyenne des trois répétitions) pour chaque souche de *Listeria* (souche de terrain : a ou souche Pasteur : b), apparaissent dans

la figure 10. Les produits stockés à 4 °C ne présentent pas de croissance en *Listeria* pour les deux souches testées, avec un maintien du taux de départ, correspondant à un allongement de la phase de latence. Par contre les échantillons conservés à 8 °C permettent une croissance des deux souches, même si cette croissance est lente et reste non significative (< à 0,5 log). Il est également observé qu'à 8 °C, la souche isolée de la viande bovine s'adapte mieux dans les produits dès les premières 24 h, alors que la souche de référence reste constante et n'amorce sa croissance qu'entre J1 et J4.

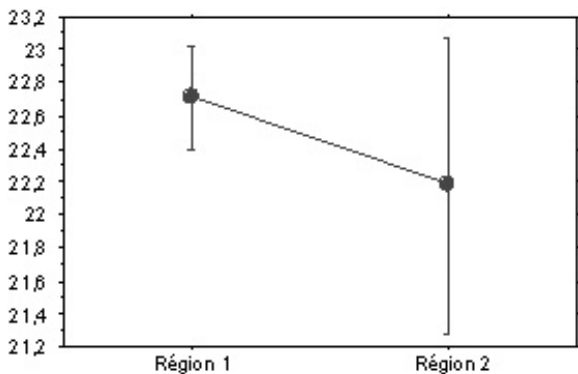
Comme le montre la figure 10, les 3 modalités testées permettent une bonne extrapolation entre 4 °C et 8 °C car la courbe selon la norme (1/3 du temps à 4 °C ; 2/3 du temps à 8 °C) se trouve bien située au milieu.

Les résultats de l'évolution de *L. monocytogenes* au cours du stockage en fonction de la température et du mode de conditionnement montrent que la température de stockage des viandes présente un effet indéniable. Il est clair qu'une chaîne de froid bien maîtrisée ne permet pas la croissance de *L. monocytogenes* et maintien constant une éventuelle contamination. La température de 8 °C, correspondant à un frigo ménager ou à une chaîne de froid mal maîtrisée est favorable au développement de *Listeria monocytogenes*.

Il est également important de noter que dans cette étape de tests de croissance, des témoins non ensemencés en *L. monocytogenes* ont été également suivis dans les mêmes conditions opératoires. Pour ces témoins les résultats obtenus ont montré une absence à tous les stades lors du stockage à 0/4 °C. Pour la température 7/8°C, dans certains cas, nous avons noté une présence à J4, mais avec un dénombrement qui est resté inférieur à 100 germes/g de produit.

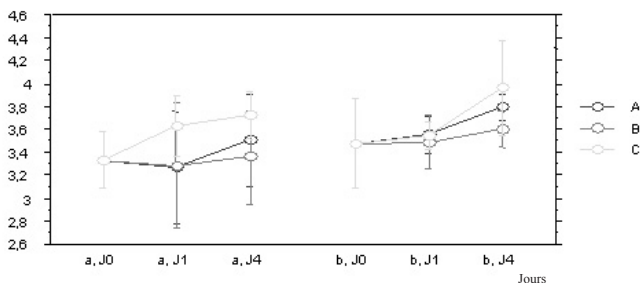
Traditionnellement, les tests de croissance sont utilisés comme un outil de décision complémentaire aux tests de vieillissement pour évaluer la DLC des produits. Cependant, la pertinence de ces tests (conditions de réalisation, le nombre de points d'analyses, le taux d'inoculum...) ne nous permet pas d'extrapoler un résultat donné à une famille de produit. Il est important de souligner que, depuis la réalisation de ce programme, l'avis de l'Afssa a été révisé et s'est traduit par la nouvelle note du 9 mars 2005.

Figure 9 : UNE BONNE QUALITÉ NUTRITIONNELLE



Résultats de la teneur en protéines pour la totalité des échantillons analysés, issus d'une région donnée

Figure 6 : LA TEMPÉRATURE DE STOCKAGE A UN RÔLE MAJEUR



a : souche de terrain (isolée de viande hachée) ; b : souche de référence  
A : conservation selon la norme XP V01-003  
B : conservation à une température constante de 0/4 °C  
C : conservation à une température constante de 7/8°C

Évolution de la population de *L. monocytogenes* ensemencée dans la viande hachée artisanale, selon la nature de la souche et le régime de température appliqué

## CONCLUSION

Dans cette étude cofinancée par l'Interbev et l'Ofival et menée par l'Adiv, les artisans bouchers souhaitaient évaluer la qualité microbiologique et biochimique de leurs viandes hachées. Puis, dans un deuxième temps, réaliser des tests de croissance sur ces mêmes viandes.

Les résultats de la première étape ont montré que sur le plan bactériologique, les viandes hachées artisanales présentent une bonne qualité. En effet, sur la quasi totalité des produits analysés, nous avons noté une absence de micro-organismes pathogènes (*Listeria*, *Salmonelle* et *Staphylococcus aureus*), ainsi que des dénombrements inférieurs au seuil de détection (< 10 germes/g de produit) pour le germe *E. coli*. Par contre, si on doit situer ces produits sur le plan réglementaire, à J0 la charge de la flore totale ne serait pas conforme et n'est donc pas en faveur de ces produits.

De plus, l'examen des flores d'altération du type: *Pseudomonas* et Entérobactéries sont également présentes à des taux non négligeables dans les viandes hachées artisanales et leurs taux ont tendance à augmenter rapidement pendant la durée du stockage.

Sur le plan biochimique, les viandes hachées artisanales peuvent être également qualifiées de très bonne qualité, avec un taux du rapport collagène/protéines faibles, une très faible teneur en matière grasse et des teneurs en protéines élevées. Même si le faible rapport Col/P et la basse teneur en matière grasse témoignent de la qualité supérieure des produits sur le plan technologique et nutritionnel, ces très faibles teneurs peuvent jouer un rôle défavorable sur la qualité organoleptique des produits.

Concernant la deuxième partie de l'étude, les challenges tests ont été réalisés selon la méthodologie décrite dans l'avis de l'Afssa

(29/10/2001) sur les viandes hachées artisanales. De l'ensemble de ces résultats de cette deuxième étape on peut conclure que l'évolution de la population de *L. monocytogenes* dépend de la température de stockage et de la souche ensemencée. *L. monocytogenes* est un germe psychrotrophe qui croit à des basses températures. Cependant, une chaîne de froid bien maîtrisée ne permet pas la croissance de ce germe et maintient constante une éventuelle contamination tout au long de la durée du stockage, alors qu'une chaîne de froid mal maîtrisée favorise la croissance de *L. monocytogenes*.