

**Altérations microbiennes liées aux
bactéries lactiques hétérofermentaires
dans le jambon cuit supérieur**

**Rapport final
ADIV/OFIVAL**

Octobre 2004

Résumé

Malgré une réglementation rigoureuse, des altérations sur le jambon cuit supérieur peuvent apparaître de façon sporadique. En effet, certains industriels constatent épisodiquement dans la masse du produit de mauvaises odeurs, du mucus filamenteux, et le gonflement des barquettes conditionnées sous atmosphère modifiée pour le jambon cuit prétranché.

Ces observations associées à des analyses bactériologiques sur les produits à défauts ont permis de conclure à une origine microbienne du phénomène.

Il s'agirait de bactéries lactiques hétérofermentaires capables de se développer au froid qui correspondraient à des lactobacilles et à des *Leuconostoc*.

L'objectif de ce programme est d'identifier le ou les germes responsables des défauts rencontrés par les industriels et de déterminer s'il existe une diversité des espèces microbiennes mises en cause dans ces altérations, grâce à un partenariat de 7 entreprises. Une meilleure connaissance de ces germes permettra aux industriels de mieux cibler les paramètres qui pourraient être à l'origine des défauts, et d'apporter les actions correctives adéquates.

Les prélèvements ont été organisés selon deux saisons : au printemps 2003 et en automne de la même année. Chaque entreprise a expédié à l'ADIV, dès leur fabrication et sous conditions réfrigérées, 5 sachets de jambon cuit supérieur tranché. Dès réception des produits et jusqu'à leur DLC, les échantillons ont été stockés à 8°C. L'apparition et le type des défauts ont été recensés tout au long de la conservation des jambons.

Seule la flore lactique hétérofermentaire est recherchée rassemblant les *Lactobacillus* hétérofermentaires et les *Leuconostoc*.

L'évolution des techniques moléculaires a permis d'améliorer l'identification des germes pathogènes, d'altération ou les flores technologiques issus des produits fermentés ou transformés garantissant ainsi la fiabilité des analyses. Cette évolution méthodologique a eu un grand intérêt dans ce programme. La méthodologie employée a permis l'identification des espèces responsables des défauts observés sur les jambons, il s'agit de *Leuconostoc carnosum* (49%) et de *Leuconostoc mesenteroides* (18%).

SOMMAIRE

1.	CONTEXTE ET OBJECTIFS	2
2.	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
2.1 -	LES LACTOBACILLES	6
2.2 -	LES LEUCONSTOC	8
2.3 -	LES BACTERIES LACTIQUES DANS LES PRODUITS A BASE DE VIANDE	9
2.4 -	CONCLUSION.....	11
3.	MATERIEL ET METHODES	12
3.1 -	LES PRELEVEMENTS	13
3.2 -	MODE ET DUREE DE STOCKAGE	13
3.3 -	ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES FLORES LACTIQUES HETEROFERMENTAIRES.....	13
3.3.1 -	Préparation des échantillons.....	14
3.3.2 -	Les lactobacilles	14
3.3.3 -	Les Leuconostoc	14
3.3.4 -	Définition de l'hétérofermentation	15
3.3.5 -	Caractérisation moléculaire des bactéries lactiques	15
4.	RESULTATS ET DISCUSSION	17
4.1 -	APPARITION DES DEFAUTS PENDANT LE STOCKAGE	18
4.2 -	RESULTATS DES DENOMBREMENTS OBTENUS.....	19
4.3 -	LES IDENTIFICATIONS MOLECULAIRES	24
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	31
6.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
7.	ANNEXE	37

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Le jambon cuit représente un des produits fondamentaux de la charcuterie cuite, bien apprécié des consommateurs français.

En France, en 1999, 238 000 tonnes de jambon cuit ont été fabriquées, soit 25% de la production totale de produits de charcuterie. En 2003, 248 000 tonnes ont été produits, représentant ainsi une augmentation continue de la fabrication du produit. Cette augmentation est confirmée par une étude menée par le Bureau Européen des Unions de Consommateurs qui, en 1996, affirmait que la France représentait 28% de la production européenne et offrait le meilleur niveau de qualité.

50% du volume de jambon est commercialisé à la coupe et 50% en libre service, ce qui représente la plus importante production charcutière en terme de volume. Au cours de ces dernières années, les industriels s'efforcent de maintenir un taux conséquent de consommation en diversifiant leurs produits. Ils commercialisent des produits diététiques, hypocaloriques, de couleur homogène afin de mieux répondre aux attentes des consommateurs et donc de les fidéliser. Aujourd'hui 72% des Français consomment régulièrement du jambon cuit : en moyenne cette consommation correspond à 5 kg de jambon cuit par an et par habitant.

Face à cette évolution croissante et constante de la consommation de jambon cuit en France, les industriels souhaitent bien maîtriser ces produits et s'affranchir de tous risques d'apparition de défauts qui pourraient entraîner des pertes économiques ou de confiance des consommateurs. C'est pourquoi un code des usages définissant les bonnes pratiques de fabrication des produits de charcuterie a été rédigé en concertation avec un large panel de fabricants industriels et d'artisans. Ce code des usages permet ainsi d'assurer la protection du consommateur. Un cadre réglementaire strict fixe les règles d'hygiène pour les fabricants. Les distributeurs suivent également ces règles et s'assurent de la conservation des produits entre 0 et +4°C.

Cependant, malgré cette réglementation rigoureuse, des altérations sur le produit peuvent apparaître de façon sporadique. En effet, certains industriels constatent :

- une présence de mauvaises odeurs dans la masse du produit,
- l'apparition de mucus filamenteux sur le produit,
- un gonflement des barquettes sous atmosphère modifiée pour le jambon cuit prétranché.

Ces observations associées à des analyses bactériologiques sur les produits à défauts ont permis de conclure à une origine microbienne du phénomène.

Il s'agirait de bactéries lactiques hétérofermentaires capables de se développer au froid qui correspondraient à des lactobacilles et à des *Leuconostoc*.

De ce fait, l'objectif du présent programme est d'identifier le ou les germes responsables des défauts rencontrés par les industriels et de déterminer s'il existe une diversité des espèces microbiennes mises en cause dans ces altérations. Une meilleure connaissance de ces germes leur permettra de mieux cibler les paramètres qui pourraient être à l'origine des défauts, et d'apporter les actions correctives adéquates.

Avant de présenter les résultats obtenus au cours de ce travail, une étude bibliographique est exposée afin de décrire les espèces bactériennes mises en cause dans les altérations des jambons cuits supérieurs.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette bibliographie s'attachera surtout à étudier la présence et le comportement des bactéries lactiques mises en cause dans l'altération des produits à base de viande.

Elle s'orientera plus particulièrement vers les *Lactobacillus* et les *Leuconostoc* dont le tableau ci-dessous exprime leurs caractéristiques propres (9).

Caractéristiques	<i>Brochothrix</i>	<i>Listeria</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i> (homo-fermentation)	<i>Leuconostoc/weissella</i> +hetero-fermentation <i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>
Aérobie stricte	-	-	+	-	-	-	-	-	D	-
Anaérobie stricte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Aérobie facultative	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-*
Catalase	+	+	+	+				-	+	-
Production de glucose par fermentation										
Endospore	+	+	No acid	+	+	+		+	D	-
Acide aminé	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
% G+C	mDAP	mDAP	Lys	Lys	mDAP	Lys, mDAP	Lys, Orn	Lys	mDAP	MDAP

2.1 - LES LACTOBACILLES

Le genre *Lactobacillus* a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positif isolées de produits laitiers et à métabolisme fermentaire. Ces bactéries possèdent la capacité de produire de l'acide lactique comme métabolite final, et sont classées dans le groupe des bactéries lactiques (10).

- **Caractères généraux**

D'un point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche des *Clostridia*, regroupant des genres tels que *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus*.

Les micro-organismes appartenant au genre *Lactobacillus* se distinguent des autres bactéries à Gram positif par le fait qu'ils sont anaérobies facultatifs, stricts ou microaérophiles, immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase. Très polymorphes, leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre de coccobacilles aux bacilles fins et allongés.

Leur métabolisme énergétique est fermentaire. Le principal produit final de la dégradation des sucres est le lactate auquel peut s'ajouter l'acétate, l'éthanol et le gaz carbonique pour les espèces hétérofermentaires. En effet, trois groupes de bactéries lactiques sont actuellement bien établis :

- Groupe 1 : les bactéries lactiques homofermentaires,
- Groupe 2 : les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives,
- Groupe 3 : les bactéries lactiques hétérofermentaires strictes.

Le premier groupe est très recherché sur le plan technologique pour diriger la fermentation, baisser le pH des produits et pour sécuriser les produits fermentés. Contrairement aux deux autres groupes qui sont à l'origine des altérations.

C'est pourquoi, dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux bactéries lactiques hétérofermentaires.

- Habitat

Les *Lactobacillus* sont présents naturellement chez l'homme et l'animal et constituent la flore autochtone dominante de la partie supérieure du tractus intestinal.

Les *Lactobacillus* sont également naturellement présents dans les aliments tels que la viande et ses dérivés ainsi que les produits laitiers.

Ils sont utilisés industriellement dans trois domaines :

- en tant que probiotiques dans l'alimentation animale,
- dans les préparations pharmaceutiques destinées à l'homme,
- en tant que ferments lactiques pour produits fermentés (dans les domaines laitiers et carnés).

Lactobacillus sakei, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* et *Lb. pentosus* sont utilisés en tant que ferments protecteurs dans les produits carnés. Ils assurent un rôle inhibiteur de la croissance de bactéries indésirables, responsables de l'altération des aliments ou potentiellement pathogènes. Ce rôle inhibiteur est attribué aux acides et aux bactériocines.

Dans l'environnement, on peut les rencontrer sur les végétaux, dans les eaux de surface et dans les eaux usées.

- Diversité des bactéries lactiques présentes dans les produits carnés

Dans les produits carnés, deux groupes de bactéries sont à distinguer :

- Celles naturellement présentes dans les produits qui sont principalement représentées par *Lb. casei*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Carnobacterium piscicola*, Ces espèces sont caractérisées par un large spectre de fermentation.
- Celles d'origine exogène ajoutées comme ferments et dont leur rôle est d'assurer une fermentation dirigée dans les produits.

Souvent les bactéries lactiques utilisées comme ferments dans les produits à base de viande sont des cultures pures appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*... Elles interviennent dans la sécurité, la texture, le goût et la qualité organoleptique des produits. Les bactéries constituant ces ferments sont des espèces définies et sont sélectionnées pour leur activité globale technologique: l'acidification, la protéolyse, la production de bactériocines...

2.2 - LES LEUCONSTOC

Les études de taxonomie numérique ont montré qu'il existe une relation étroite entre les *Leuconostoc* et les lactobacilles hétérofermentaires (10).

- Caractères généraux

Les espèces du genre *Leuconostoc* se présentent sous forme d'éléments coccoïdes à lenticulaires et/ou coccobacilles à Gram positif.

Ils sont immobiles, non sporulés et se développent en aérobiose et en anaérobiose.

Les *Leuconostoc* sont dépourvus de catalase et de cytochrome oxydase. Les enzymes protéolytiques sont absentes et l'arginine n'est pas catabolisée. Le glucose est fermenté avec une production de gaz par voie hétérofermentaire. La température optimale de croissance de ces bactéries se situe entre 20 et 30°C.

- Habitat

Les *Leuconostoc* sont habituellement rencontrés sur les végétaux ainsi que les produits laitiers, le vin, les liquides à base de sucre. Leur présence intervient dans le goût et l'arôme du lait est due à la production de certains composés aromatiques comme l'acétoïne et le diacétyl.

Il n'est donc pas surprenant de retrouver des espèces du genre *Leuconostoc* dans la cavité buccale et dans le tube digestif de l'homme ou des animaux.

Ces bactéries sont également connues dans les industries alimentaires pour les sérieux dommages qu'elles peuvent provoquer.

Leuconostoc mesenteroides, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* sont souvent présentes naturellement dans les produits à base de viande. Les conditions qu'ils vont rencontrer dans les produits (qualité de la matière première, température, pH...) vont soit favoriser soit limiter leur croissance. Dans des conditions favorables à leur croissance, ils deviennent dominants et peuvent alors engendrer des dommages sur les produits.

2.3 - LES BACTERIES LACTIQUES DANS LES PRODUITS A BASE DE VIANDE

Actuellement, il est clairement établi que les conditionnements sous vide ou sous atmosphère modifiée favorisent les bactéries lactiques qui deviennent majoritaires.

Sporadiquement, dans de tels conditionnements, des défauts apparaissent sur des produits à base de viande. Ces altérations présentent une difficulté capitale pour les industriels de l'agroalimentaire, avec des conséquences sensorielles négatives pour le consommateur (12).

En effet, les principaux défauts observés montrent :

- *une production excessive de gaz (CO₂)* due à une décarboxylation des acides aminés (9),
- *des phénomènes de décoloration des viandes* par production d'acides tels que l'acide lactique, l'acide acétique, et par production d'alcool comme l'éthanol....

Borch *et al.* (4) ont mis en évidence *Weissella viridescens* comme germe responsable de la décoloration d'émulsions cuites. Ces germes seraient, de plus, thermotolérants.

- *l'apparition de verdissement* par la production d'eau oxygénée

Cantoni *et al.* (7) ont isolé *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus brevis/buchneri* et *Weissella viridescens* comme responsables des phénomènes de décoloration de charcuteries de bœuf via la formation d'eau oxygénée (H₂O₂).

La contamination en germes verdissants peut également apparaître après cuisson via des lactobacilles (*Lb. acidophilus*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*), *Leuconostoc*, *Weissella* mais aussi certains *Enterococcus* et *Pediococcus* (4).

- *la production de mucus filamenteux (polysaccharide)*, sur des viandes cuites à basse température. Rongguang *et al.* (16) ont montré que des chocs thermiques durant la conservation sous vide de viandes cuites à basse température, pouvaient induire la

croissance de *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc carnosum*, responsables du limonage des produits (polysaccharides).

Le tableau ci-dessous montre que la contamination principale des produits transformés est essentiellement liée à des *Lactobacillus ssp* et *Leuconostoc/Weissella*. Ces deux espèces se développent plus facilement dans des produits emballés sous atmosphère modifiée (9).

Produit	Conditionnement	Durée de vie	Croissance						
			<i>Leucon./ Weissella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Br.thermos- phacta</i>	<i>Micro./ Staph.</i>	<i>Coryneforms</i>	<i>Liseria mono.</i>
Viande	Air/Aérobie	jours	++	+(+)	++	++/+++	++	++	++
	Atmosphère modifiée	jours	++(+)	++	++(+)	+++	+	++	+
	Sous vide	Semaine/mois	+++	+++	++	+	(+)	+	****
	100% CO ₂	mois	+++	+++	+(+)	(+)_	-	-	-
Viandes haut pH	Sous vide	Jours semaines	++/+++	+++	+++	++/+++	+	+(+)	++++
	100% CO ₂	Semaine/mois	++	+++	++	_(+)	-	-	-
Produits à base de viande	Air/Aérobie	Jours	++	++/+++	+	+++	+	++	+
	Sous vide	Semaines	++	+++	+(+)	+(+)	-	(+)	****
	CO ₂ + N ₂	semaines	++(+)	+++	+	+	-		-
Volaille	Air/Aérobie	Jours	+	++	++	++	+	++	++

+++ croissance importante; ++ bonne croissance; + croissance modérée et lente; _ pas de croissance

Les conclusions d'études bibliographiques, principalement orientées sur les altérations dans les viandes conditionnées sous atmosphère modifiée, confirment l'étude précédente (9) qui démontre que les *Lactobacillus* et les *Leuconostoc* sont les principales espèces impliquées dans ces altérations.

En effet, Mäkelä *et al.* (14) ont montré que deux espèces de *Lactobacillus* : *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* sont majoritairement présentes lors des altérations des viandes. Egalement Sawaya *et al.* confirment leur présence sur les produits de volailles conditionnés sous atmosphère modifiée (18). *Lb. carnosum* et *Lb. gelidum* sont également des espèces communes rencontrées dans ces matrices altérées (19).

Des analyses effectuées à différentes étapes du process de fabrication du jambon cuit (17), montrent que les bactéries lactiques hétérofermentaires dominant et sont responsables de l'altération du jambon cuit conditionné sous vide stocké au froid positif (+4°C et +12°C), *Lb. sakei* et *Leuconostoc mesenteroides* comme espèces bactériennes incriminées.

Mäkelä *et al.* (14) ont identifié sur des produits altérés à base de viandes *Lb. sakei*, *Lc. amelibiosum* comme dominantes et quelques souches de *Lc. mesenteroides* en se basant sur les homologies ADN-ADN. Cette étude confirme une nouvelle fois que ces espèces sont responsables des défauts rencontrés sur les viandes.

Björkroth *et al.* (3), par l'analyse des homologies des séquences d'ADNr 16S, ont caractérisé une nouvelle espèce de *Leuconostoc* baptisée *Lc. gasicomitatum sp. nov.* Grâce à la PCR multiplex, outil de biologie moléculaire, 4 groupes majeurs de bactéries lactiques ont été identifiées : *Lc. spp*, *Lb. curvatus*, *Lc. mesenteroides* et *Carnobacterium piscicola* (23).

2.4 - CONCLUSION

Cet aperçu bibliographique permet de mettre en évidence l'importance des bactéries lactiques dans l'apparition des phénomènes de limonage (production de polysaccharides), dans les phénomènes de gonflement de barquettes des charcuteries cuites, en identifiant principalement les lactobacilles hétérofermentaires tels que *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* et d'autres *Leuconostoc*.

Certains lactiques homofermentaires peuvent être également à l'origine de ces contaminations qui se traduisent par l'apparition de mauvaises odeurs sur les produits.

Compte tenu de ces observations, **dans le présent programme, l'étude va directement s'orienter vers l'identification des bactéries lactiques responsables des altérations constatées sur le jambon cuit supérieur.**

3. MATERIEL ET METHODES

3.1 - LES PRELEVEMENTS

Les prélèvements ont été organisés selon deux périodes :

- Au printemps : de mai à juillet 2003,
- En automne : de septembre à novembre 2003.

Un partenariat de 7 entreprises a permis la mise en œuvre de ce programme.

Chaque entreprise a expédié à l'ADIV, dès leur fabrication et sous conditions réfrigérées, 5 sachets de jambon cuit supérieur tranché (en moyenne 4 tranches par sachet). Un seul partenaire (entreprise F) a expédié, dès leur production, des jambons entiers à raison de 5 jambons entiers par expédition.

3.2 - MODE ET DUREE DE STOCKAGE

Dès réception des produits à l'ADIV et jusqu'à leur DLC, les échantillons ont été stockés à 8°C, température correspondant à un frigo ménager ou à une chaîne du froid mal maîtrisée. Ceci dans le but de faire apparaître les défauts et d'analyser les germes développés.

L'apparition et le type de défauts ont été recensés tout au long de la conservation des jambons.

3.3 – ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES FLORES LACTIQUES HETEROFERMENTAIRES

Seule la flore lactique hétérofermentaire est recherchée rassemblant les *Lactobacillus* hétérofermentaires et les *Leuconostoc*.

Les analyses ont été effectuées à DLC, les prélèvements ont été réalisés soit au milieu des tranches de jambon, soit à coeur dans le cas des jambons entiers.

3.3.1 - Préparation des échantillons

Les échantillons et la suspension mère ont été préparés selon la norme AFNOR NF V 08-010-2.

Vingt cinq grammes de chaque échantillon ont été prélevés de façon stérile et dilués au dixième dans de l'eau peptonnée tamponnée puis homogénéisés à l'aide d'un broyeur à palettes stomacher pendant une minute à température ambiante.

La suspension ainsi obtenue constitue la suspension mère qui a servi pour la réalisation d'une gamme de dilutions sérielles.

L'ensemencement sur boîte de Pétri est ensuite effectué selon le protocole de dénombrement spécifique aux lactobacilles et aux *Leuconostoc*.

3.3.2 – Les lactobacilles

Le dénombrement des lactobacilles suit les exigences imposées par la norme AFNOR V 08-030. Les ensemencements sont réalisés sur une gélose Man, Rogosa et Sharpe (MRS, OXOID, Dardilly, France) en utilisant les dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 48 à 72 h.

3.3.3 – Les *Leuconostoc*

Le dénombrement des *Leuconostoc* s'effectue sur le milieu Mayeux Sanidine Elliker (dit « Mayeux », AES, Combours, France). Les ensemencements ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour les lactobacilles, les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 4 à 5 jours. Sur le milieu Mayeux, les colonies caractéristiques de *Leuconostoc* sont de grandes colonies visqueuses en surface de gélose.

Après isolement des différentes colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...), les tests d'hétérofermentation sont lancés sur 5 colonies.

3.3.4 – Définition de l'hétérofermentation

Par définition, l'hétérofermentation est la capacité des bactéries lactiques à produire des molécules différentes du lactate telles que le CO₂, l'acétate, l'éthanol... à partir du sucre.

Pour distinguer les bactéries lactiques homofermentaires des bactéries lactiques hétérofermentaires, des tests d'hétérofermentation sont réalisés. Ils consistent en le repiquage d'une colonie donnée dans un tube de bouillon MRS contenant au préalable une cloche de Durham. Après ensemencement de la colonie, le bouillon est recouvert de paraffine et l'ensemble est mis à incuber à 30°C. Les tubes sont observés pendant 3 à 5 jours en fonction de l'aspect du milieu (trouble), le décollement de la paraffine, et le dégagement gazeux dans la cloche.

Les souches qui ont donné un résultat positif à ces observations ont été retenues.

Ces souches retenues ont été repiquées sur milieu MRS afin de s'assurer de la pureté des cultures pour ensuite constituer une échantillothèque. La conservation de ces souches se fait sur cryobilles qui sont conservées à -20°C avant leur analyse moléculaire.

3.3.5 - Caractérisation moléculaire des bactéries lactiques

a. Extraction des acides nucléiques

Chaque souche, conservée à -20°C, est décongelée, repiquée sur milieu MRS, puis mise en culture sur milieu MRS liquide. Les extractions d'ADN sont réalisées sur colonne de silice.

Les extraits d'ADN ainsi purifiés permettront d'effectuer :

- le typage moléculaire par PCR (Polymerase Chain Reaction) en présence d'amorces consensuelles, homologues d'éléments répétés des génomes. Les empreintes ont été comparées par analyse bio informatique ;
- les identifications par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr) avec une comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales.

b. Le typage moléculaire

La méthodologie choisie est basée sur l'amplification de régions des génomes à discriminer, grâce à des amorces consensuelles, homologues de séquences répétées : les éléments REP (Repetitive Extragenic Palindromic element). La séquence consensus REP dérive de l'alignement de plusieurs séquences REP. Les éléments REP comptent pour 0.5 à 1% du génome total. Des études ont permis de mettre en évidence une conservation des séquences REP au sein d'une même espèce, avec cependant, des variations infra-spécifiques : ceci concerne aussi bien la structure primaire que la répartition sur le chromosome.

La méthode REP-PCR apparaît non restrictive à un niveau phylogénétique donné, et permet aussi bien l'étude d'une souche particulière que celle de l'espèce ou du genre dans son ensemble.

Les profils ont été comparés par analyse bio informatique, afin d'établir des parentés génomiques inter-souches au sein d'une même espèce.

Au total, 24 isolats issus des jambons ont été analysés.

La diversité des isolats est apparue restreinte et l'analyse des génomes par REP-PCR a été effectuée pour l'ensemble des isolats afin de sélectionner les isolats à identifier après comparaison des profils.

Ainsi, 267 empreintes ont été obtenues et comparées en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), associé au coefficient de Pearson.

Ces isolats à identifier ont été sélectionnés selon un seuil de 80% d'homologie entre les empreintes.

c. Identification moléculaire

Les identifications ont été effectuées par séquençage et comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales de l'extrémité 5' de l'ADN ribosomique codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). Plus de 600 paires de bases ont été analysées par génome. Les résultats obtenus sont résumés sur le dendogramme présenté en annexe.

Au total, 189 identifications ont été réalisées.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 – APPARITION DES DEFAUTS PENDANT LE STOCKAGE

Les conditions de stockage définies précédemment sont synonymes de conditions accélérées de vieillissement. Ce mode de stockage a permis d'observer différentes altérations avec une certaine chronologie entre la date de fabrication et la DLC du produit, c'est-à-dire jusqu'à 35 jours de stockage. Pendant la durée de conservation des produits, à partir du 5^{ème} jour, les défauts suivants ont été observés :

- J5 à J7 : apparition d'exsudation,
- J8 à J12 : apparition sur le produit de reflets roses, verts ou nacrés,
- J12 : début du gonflement des sachets,
- J13 : apparition d'un jus clair,
- J14 à J25 : apparition de tâches blanches en surface du produit,
- J26 à J35 : accroissement du gonflement des sachets, de l'exsudation et le jus clair devient laiteux.

Ces défauts recensés dans cette étude présentent des similitudes avec les accidents de fabrication et/ou les produits altérés couramment reçus dans les laboratoires d'analyses.

Bien que les conditionnements sous-vide ou sous atmosphère modifiée sont communément utilisés pour permettre aux produits frais à base de viande une meilleure durée de vie pour ces produits (5), ils permettent le développement de microorganismes qui peuvent être à l'origine de défauts.

Les travaux de Borch *et al.* (5) recensent les bactéries capables de se développer et d'entraîner une altération des viandes ou des produits à base de viande (de bœuf ou de porc) cuite ou crue quelque soit le mode de conditionnement utilisé (sous-vide, sous atmosphère modifiée ...).

Ces bactéries appartiennent à la famille des bactéries lactiques et les espèces suivantes ont été isolées sur les produits : *Lactobacillus spp*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* ; *Leuconostoc spp*, *Lc. gelidum*, *Lc. carnosum*, *Lc. mesenteroides*. Egalement, *Lactobacillus viridescens*, *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, et *Brochothrix thermosphacta*.

Ainsi, l'atmosphère créée, offre aux bactéries lactiques dites « acides » une facilité de croissance, dont la qualité et la nature peut entraîner une altération des produits. Ces défauts se présentent sous la forme de mauvaises odeurs, de décoloration du produit, une certaine acidité des viandes par de diminution du pH, et de production de gaz (1).

Le nombre et la nature des espèces lactiques isolées des produits à défauts sont variables. La contamination indésirable peut être liée à une seule espèce bactérienne mais dans la plupart des cas, un mélange de *Lactobacillus spp* et de *Leuconostoc spp* est retrouvé. Cette diversité des bactéries, isolées des produits altérés, a été confirmée par plusieurs travaux (12, 21 et 22).

4.2 – RESULTATS DES DENOMBREMENTS OBTENUS

Lactobacilles

Dans cette étude, dès l'apparition des défauts, les *Lactobacillus* et les *Leuconostoc* ont été dénombrés sur leur milieu sélectif. Au total, 250 analyses ont été effectuées pour la première période de prélèvements et 161 pour la seconde période. Les dénombrements respectifs obtenus sont présentés dans les figures ci-après.

Les analyses effectuées après les deux campagnes de prélèvements, printemps et automne, montrent une contamination homogène en flore lactique pour chaque entreprise. Le facteur saison ne semble pas jouer un rôle sur le nombre total de cette flore, car à DLC des produits et quel que soit la période de prélèvement, la concentration en flore lactique varie entre 10^7 et 10^8 germes par gramme de jambon stockés à $+8^{\circ}\text{C}$ (fig. 1).

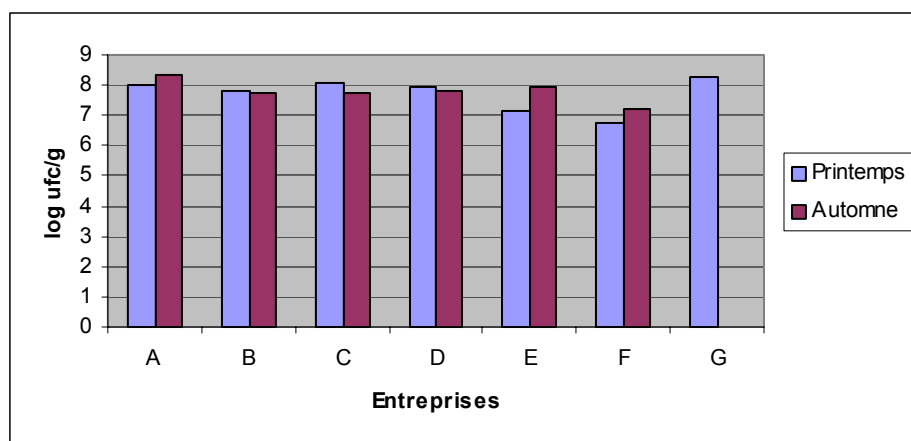


Figure 1. Dénombrement des lactobacilles sur milieu MRS (log ufc/g) par entreprises.

Après le dénombrement, l'isolement des colonies caractéristiques de *Lactobacillus* sur milieu MRS ainsi que les tests d'hétérofermentation ont été réalisés. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 2. Ils montrent une hétérogénéité des pourcentages de *Lactobacillus* hétérofermentaires obtenus pour chaque entreprise et en fonction des saisons.

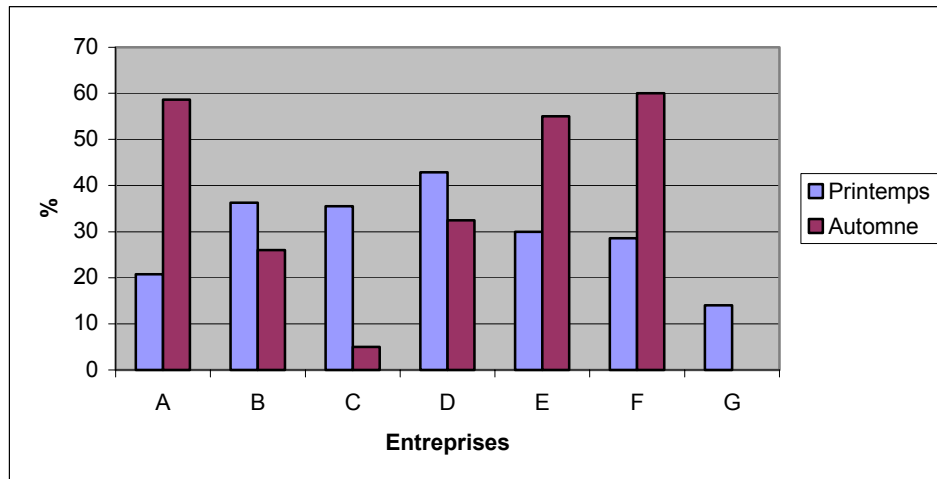


Figure 2. Pourcentage des lactobacilles hétérofermentaires isolés.

La figure 3 confirme cette observation où deux groupes d'entreprises se démarquent en fonction des deux périodes de campagne de prélèvements. Le premier groupe recense les entreprises A, E et F où on observe une augmentation des pourcentages des *Lactobacillus* hétérofermentaires en automne. Le second groupe rassemble les entreprises B, C et D où contrairement au premier groupe, les pourcentages diminuent en automne.

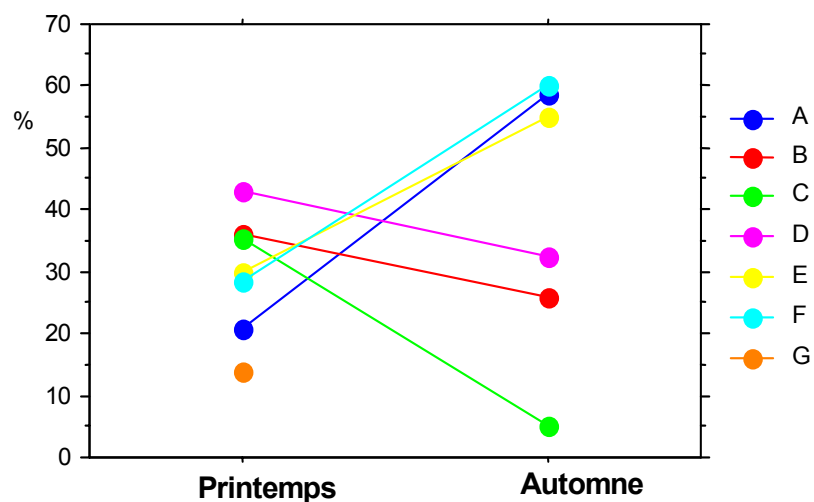


Figure 3. Effet des saisons. Contamination des jambons cuits par les *Lactobacillus* hétérofermentaires dans les différentes entreprises en fonction des saisons.

Quant à l'entreprise G, qui forme un groupe à part, seuls 5 sachets de jambons cuits ont été envoyés lors de la première campagne de mesures. Les résultats obtenus n'ont pu être exploités et sont donnés à titre indicatif.

Leuconostoc

Concernant les *Leuconostoc*, la figure 4 met en évidence une hétérogénéité des dénombrements de ces germes lors des campagnes de prélèvements pour les entreprises B, D, E et F.

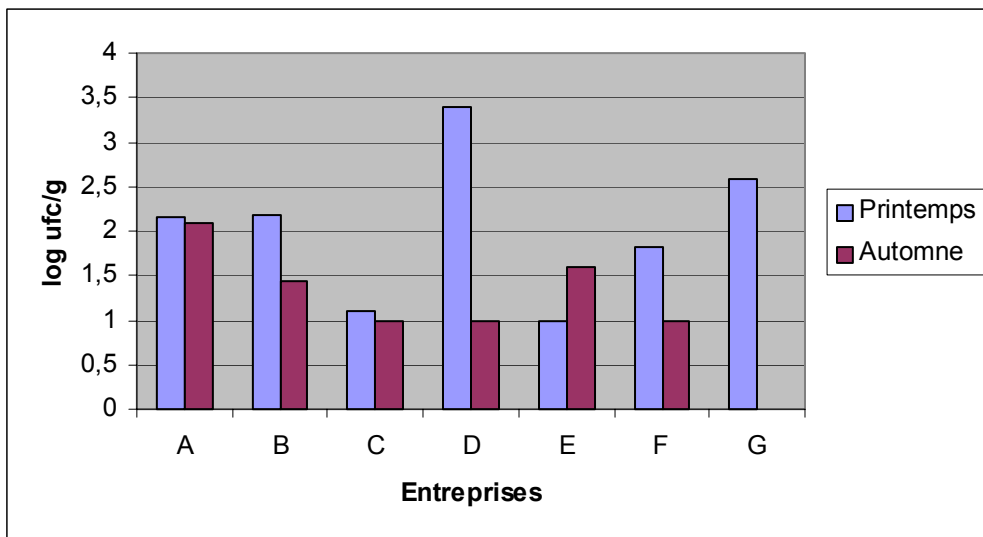


Figure 4. Dénombrement des *Leuconostoc* sur milieu Mayeux.(log ufc/g)

La figure 5 confirme cette observation et l'illustre par la définition de deux groupes d'entreprises : le premier groupe rassemblant les entreprises B, D et F présente une diminution des dénombrements des *Leuconostoc* à l'automne; le second groupe identifié par les entreprises A, C et E montre une augmentation des dénombrements à l'automne.

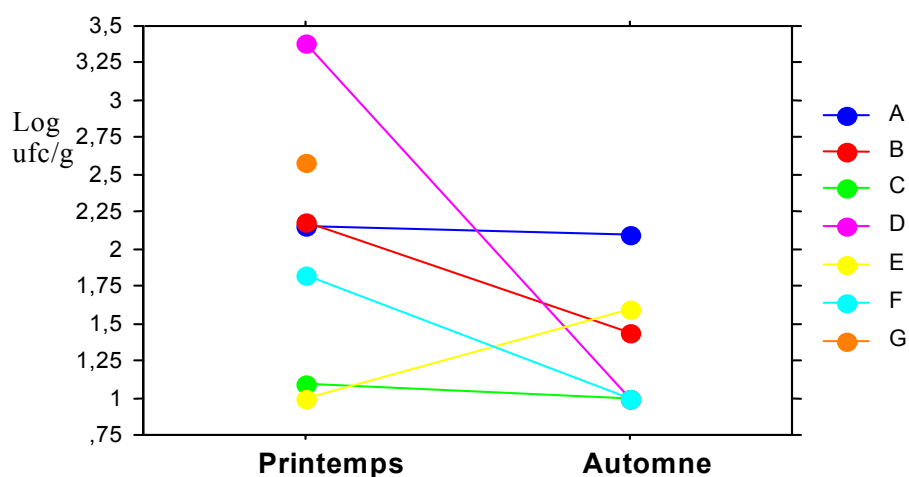


Figure 5. Effet des saisons. Contamination des jambons cuits par les *Leuconostoc* dans les différentes entreprises en fonction des saisons.

Cette phase de dénombrement et d'isolement a permis de confirmer que c'est la flore lactique qui se trouve être majoritaire dans ce type de produit, si les conditions de stockage et de conservation ne sont pas respectées. Cette étape a permis d'identifier quatre groupes d'entreprises, définis en fonction des deux groupes de flore lactique analysées. Compte tenu du caractère saisonnier des dénombrements, ces groupes laissent supposer l'existence d'au moins deux ou plusieurs espèces d'altérations.

Cette diversité sera confirmée par les analyses moléculaires effectuées dans la seconde partie de l'étude.

4.3 – LES IDENTIFICATIONS MOLECULAIRES

L'évolution des techniques moléculaires ont permis d'améliorer l'identification des germes pathogènes, d'altération ou les flores technologiques issus des produits fermentés ou transformés garantissant ainsi la fiabilité des analyses.

Cette évolution méthodologique a eu un grand intérêt dans ce programme. La méthodologie employée a permis des identifications des espèces illustrées par le tableau 1. En effet, l'étude bibliographique préalable nous avait permis de nous orienter vers la flore lactique hétérofermentaire et vers les *Leuconostoc* comme germes responsables des défauts observés sur les jambons. Or d'après les dénombrements (fig. 1, 2 et 4), on s'attendait à identifier en flore dominante des *Lactobacillus* hétérofermentaires accompagnés de quelques *Leuconostoc*. Au contraire, une majorité d'espèce du genre *Leuconostoc* a été identifiée, avec un pourcentage de 70.80% (Tabl. 1).

Le milieu Mayeux utilisé dans le but de rechercher et de dénombrer les *Leuconostoc* n'a pas donné de résultats probants (15). Après concertation avec notre fournisseur et une évolution fiche technique d'utilisation de ce milieu, cette gélose permet bien la croissance des *Leuconostoc*, mais des *Leuconostoc* spécifiques du lait et des produits laitiers, gélose spécifique de *Leuconostoc kefir* et de *Leuconostoc dextranicum*. Néanmoins, d'autres espèces de *Leuconostoc* sont capables de se multiplier sur ce milieu, ce qui explique les numérations obtenues.

Par contre, les *Leuconostoc* se développent bien sur le milieu MRS, les dénombrements représentés dans la figure 1 prennent en compte à la fois la flore lactique et les *Leuconostoc*.

Le dendogramme, présenté en annexe, a été défini par comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales. Le tableau 1 correspond à la synthèse des identifications obtenues par entreprises et selon les saisons.

Entreprises	Saisons	<i>Leuconostoc</i>				<i>Lactobacillus</i>			<i>Hafnia alvei</i>	Souches identifiées	Souches Non identifiées	Total
		<i>Lc carnosum</i>	<i>Lc mesenteroïdes</i>	<i>Lc citreum</i>	<i>Lc gasomitatum</i>	<i>Lb sakei</i>	<i>Lb brevis</i>	<i>Lb paraplantarum</i>				
A	Printemps	6	4			1				11	0	11
	Automne	22		1		2				25	0	25
B	Printemps	25	23	2	1	6				57	4	61
	Automne	19	3			1				23	5	28
C	Printemps	4				1				5	0	5
	Automne					1				1	2	3
D	Printemps	25	4			6				35	1	36
	Automne	8								8	1	9
E	Printemps		1			1	2	1		5	1	6
	Automne	3	2	4					1	10	7	17
F	Printemps	2	4							6	6	12
	Automne	1								1	15	16
G	Printemps				1	1				2	2	4
	Automne									0	0	0
Total		115	41	7	2	20	2	1	1	189	44	233
%		49.35	17.59	3	0.85	8.60	0.85	0.43	0.43	81.1	18.9	100
% (par espèces identifiées)		70.80				9.87			0.43		18.9	100

Tableau 1. Récapitulatif des identifications moléculaires (en nombre d'identification) pour chaque entreprise et en fonction des saisons.

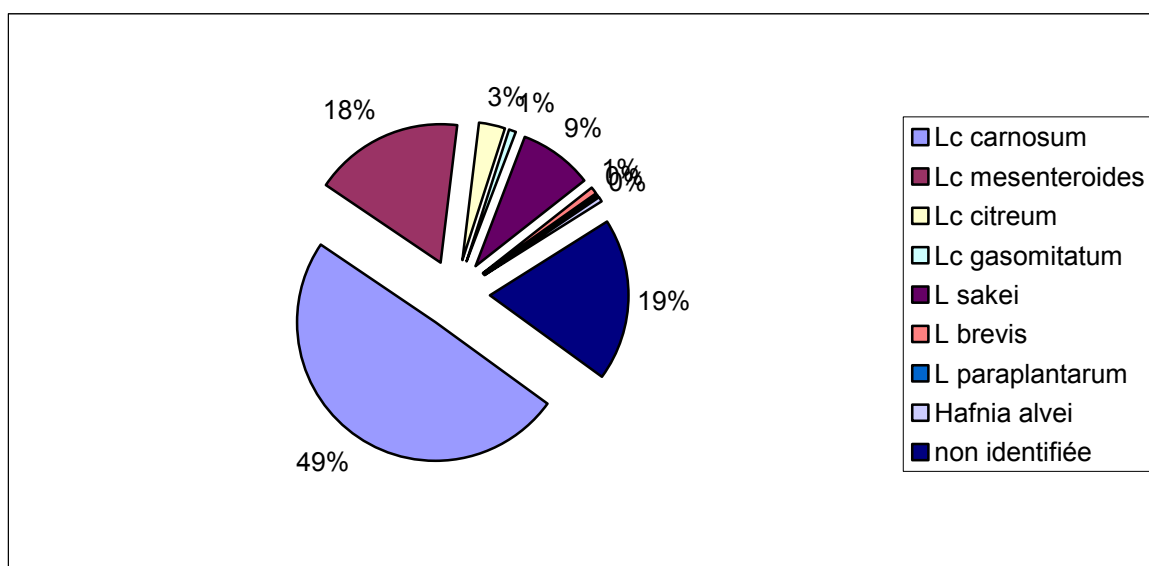


Figure 6. Pourcentage global des différentes souches identifiées.

La figure 6 résume la proportion de souches identifiées toutes entreprises et toutes saisons confondues. Le tableau 1 montre que 70% des souches isolées appartiennent au genre *Leuconostoc*. Les *Lactobacillus* représentent moins de 10% des souches identifiées et les 18.9% s'apparentent à d'autres espèces non identifiées par la méthode moléculaire employée. Des résultats similaires ont été observés par d'autres auteurs (2, 3, 6 et 17). Parmi les *Leuconostoc* majoritairement isolés, deux espèces ont été identifiées comme étant les espèces d'altération majoritaires dans les jambons analysés. Il s'agit de *Leuconostoc carnosum* (49%) et de *Leuconostoc mesenteroïdes* (18%).

Cette étude montre que le genre/espèce de bactéries lactiques responsables des altérations dépend de la composition du produit et de l'entreprise (11). En effet, le dendogramme (cf. annexe) montre une diversité inter-spécifique restreinte dont de nombreux isolats présentent des profils REP-PCR différents et appartenant à l'espèce *Leuconostoc carnosum* (synthèse Tableau 1).

Une étude de Cai *et al.* (6) s'est orientée sur l'origine bactérienne des altérations des jambons cuits où les différents microorganismes isolés s'apparentaient à des bactéries hétérofermentaires, capables de se développer à de basses températures. De plus, l'analyse des séquences de l'ADNr 16S ont montré que ces organismes sont principalement représentés par *Leuconostoc carnosum*, base de l'arbre phylogénique. Dans cette même étude, les hybridations ADN-ADN obtenues attestent que tous les groupes de *Leuconostoc* issus du

jambon présentent 88.8% d'homologie de l'ADN, démontrant ainsi que ces groupes composent une seule espèce assignée à *Leuconostoc gelidum*, identifiée en tant qu'espèce dominante d'altération des produits.

Au cours de notre programme, *Leuconostoc carnosum* (49%) a été identifié comme étant l'organisme majeur de l'altération des jambons. *Leuconostoc mesenteroides* est également impliqué dans les altérations des jambons, à 18% (fig.6). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Cai *et al.* et aussi par d'autres études. Ainsi dans une étude réalisée par Björkroth *et al.* (2), où *Leuconostoc carnosum* a également été identifié comme étant le germe responsable des altérations des jambons cuits, conditionnés, ici, sous vide.

Ces mêmes auteurs se sont intéressés comme nous à la contamination des entreprises et ont pu constater que *Leuconostoc carnosum* de type A est la bactérie dominante de la microflore des matières premières de porc.

Par ailleurs, les *Leuconostoc spp* sont des microorganismes d'altération spécifiques des produits transformés à base de viande (bœuf, porc, volaille) ou de poissons. Les études précédemment citées ainsi que les résultats obtenus au cours de ce programme ont conclu à une contamination du jambon cuit, donc du porc, par *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc gelidum* taxonomiquement très proches.

Leuconostoc gasicomitatum est quant à lui, spécifique des viandes marinées (20). Il se retrouve également dans les poissons marinés, accompagné de *Leuconostoc gelidum* (13).

Leuconostoc mesenteroides et quelques espèces de *Lactobacillus* dont *Lb. Sake*, *Lb curvatus* sont retrouvés dans les saucisses fraîches (8).

Ces espèces bactériennes sont à la fois associées au produit (matrice) mais également au conditionnement utilisé par les industriels. En effet, les poissons (13) sont préservés en présence d'acide acétique favorisant le développement de *Leuconostoc gasicomitatum*.

Les bactéries hétérofermentaires représentent la microflore dominante des viandes conditionnées sous atmosphère modifiées grâce à leur résistance au CO₂ environnant, leur taux de croissance à de faibles températures, et la production de substances inhibitrices (comme les acides organiques), de polymères extracellulaires (tel que les dextrans), également la production de substances protéiniques antagonistes : les bactériocines.

L'accumulation de gaz (CO₂) est souvent associée à la croissance des *Leuconostoc* comme *Ln. mesenteroides*, *Ln. carnosum* et *Ln. amelibiosum*. (8, 14 et 22).

Entreprises	Saisons	<i>Lc carnosum</i>	<i>Lc mesenteroides</i>	<i>Lc citreum</i>	<i>Lc gasomitatum</i>	<i>Lb sakei</i>	<i>Lb brevis</i>	<i>Lb paraplantarum</i>	<i>Hafnia alvei</i>	Souches non identifiées
A	Printemps	54.5	36.4	0	0	9.1	0	0	0	0
	Automne	88	0	4	0	8	0	0	0	0
B	Printemps	41	37.70	3.3	1.6	9.8	0	0	0	6.6
	Automne	67.85	10.72	0	0	3.58	0	0	0	17.85
C	Printemps	80	0	0	0	20	0	0	0	0
	Automne	0	0	0	0	33.3	0	0	0	66.7
D	Printemps	69.4	11.1	0	0	16.7	0	0	0	2.8
	Automne	88.8	0	0	0	0	0	0	0	11.2
E	Printemps	0	16.67	0	0	16.67	33.32	16.67	0	16.67
	Automne	17.7	11.8	23.5	0	0	0	0	5.8	41.2
F	Printemps	16.67	33.33	0	0	0	0	0	0	50
	Automne	6.25	0	0	0	0	0	0	0	93.75
G	Printemps	0	0	0	25	25	0	0	0	50
	Automne	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 2. Pourcentage des souches identifiées par analyses moléculaires (%).

Le tableau 2 présente la proportion (%) des souches identifiées pour chaque entreprise et en fonction des saisons. Cette synthèse (tableau2) a permis d'illustrer les figures 7a et 7b, ci-après, qui présentent les espèces dominantes en fonction des entreprises et des saisons.

figure 7a.

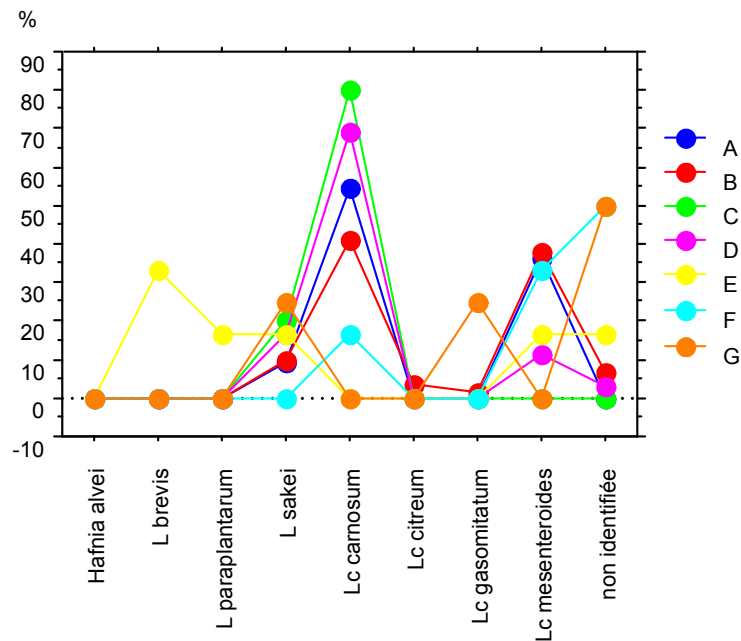
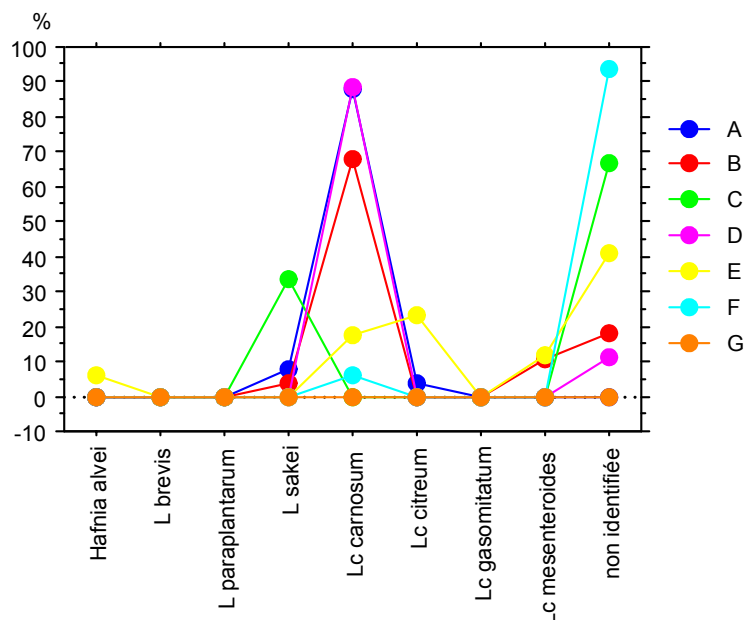


figure 7b.



Figures 7 a et b. Pourcentage des espèces identifiées en fonction des entreprises et des saisons : printemps (a) et automne (b).

Les deux figures 7a et 7b montrent que l'espèce *Leuconostoc carnosum* est majoritaire au printemps et à l'automne. Quant à *Leuconostoc mesenteroides*, elle est présente au printemps mais pas pour toutes les entreprises. Cette dernière est minoritaire en automne.

Le typage moléculaire a permis de mettre en évidence une conservation des séquences « répétées » au sein d'une même espèce avec cependant des variations infra-spécifiques.

Ainsi la comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales a montré une diversité inter-spécifique restreinte où les isolats appartiennent pour 49% à l'espèce *Leuconostoc carnosum* et pour 18% à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* (fig. 6).

Ces deux espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides* (Tabl. 2) sont majoritairement représentées, mais différemment selon les saisons. En effet, pour les entreprises A, B, C, D et F, *Leuconostoc carnosum* est majoritaire au printemps, mais se retrouve majoritaire à l'automne uniquement pour les entreprises A, B et D. De même, pour *Leuconostoc mesenteroides*, on la retrouve au printemps pour les entreprises B, D, E et F ; mais apparaît uniquement en automne dans les entreprises B et E. (fig. 7 a et b).

Les figures 7a et 7b montrent qu'il existe une diversité entre les entreprises plus marquée au printemps par rapport à l'automne où *Leuconostoc carnosum* reste majoritaire.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de cette étude a été d'identifier les bactéries responsables des défauts observés sur les jambons cuits en les plaçant dans des conditions favorables au développement bactérien (stockage régulé à +8°C). Cette étude nous a permis de confirmer le rôle des bactéries lactiques hétérofermentaires dans l'altération du produit et surtout d'identifier les espèces majoritaires. Ce travail a en effet permis de mettre en évidence que les *Leuconostoc* sont impliquées dans l'altération des jambons cuits, plus particulièrement les espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides*.

Grâce à ces identifications, il semblerait intéressant de compléter les résultats obtenus. En effet, afin de s'assurer et de garantir la responsabilité des *Leuconostoc* et, notamment des deux espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides*, il serait intéressant de compléter cette étude en reproduisant les défauts par ensemencement de deux souches isolées, sur des cubes de jambon cuit stériles soumis à un stockage sous vide à +8°C.

Egalement, l'origine de la contamination pourrait être recherchée en effectuant des prélèvements sur le produits aux différentes étapes du process, des prélèvements de surface sur les matériels et les opérateurs, également des prélèvements d'intrants, c'est à dire l'eau, l'air, la saumure, les additifs... Ainsi les données obtenues permettront de connaître plusieurs éléments concernant ces deux germes d'altération étudiés soit :

- L'origine de la contamination (matière première, matériel, personnel, ...)
- Les facteurs technologiques d'apparition (corrélation au process)
- La thermorésistance

En effet, face aux accidents technologiques, deux cas de figure peuvent se présenter :

- soit la ou les bactéries sont thermorésistantes et la contamination peut avoir lieu avant cuisson,
- soit la ou les bactéries ne sont pas thermorésistantes et la contamination se déroule au cours des étapes de déballage/reconditionnement.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Björkroth J. and Korkeala H. 1997. Use of rRNA genre restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole meat product in a meat processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** :448-453.
- (2) Björkroth J., Vandamme P., and Korkeala H. 1998. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum* associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** :3313-3319.
- (3) Björkroth J., Geisen R., Schillinger U., Weiss N., De Vos P., Holzappel W., Korkeala H., and Vandamme P. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinaded broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** :3313-3319.
- (4) Borch E et al. 1988. Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausages, *Int. J-Food. Microbiol*, 7, p.317-330.
- (5) Borch E., Kant-Muermans ML. And Blixt Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **33**:103-120.
- (6) Cai Y., Benno Y., Takeda A. Yoshida T., Itaya T. and Nakasa T. 1998. Characterization of *Leuconostoc* species isolated from vacuum-packaged ham. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**:153-159.
- (7) Cantoni C. et al. (1992) – Origin and causes of discoloration of bresaola-Ingeneria alimentare le conserve animali, 8 (1) p.20-23
- (8) Dykes G. A., Cloete T. and Von Holy A. 1994. Identification of *Leuconostoc* species associated with the spoilage of vacuum-packaged Vienna sausages by DNA-DNA hybridization. *Food Microbiol.* **11**:271-274.

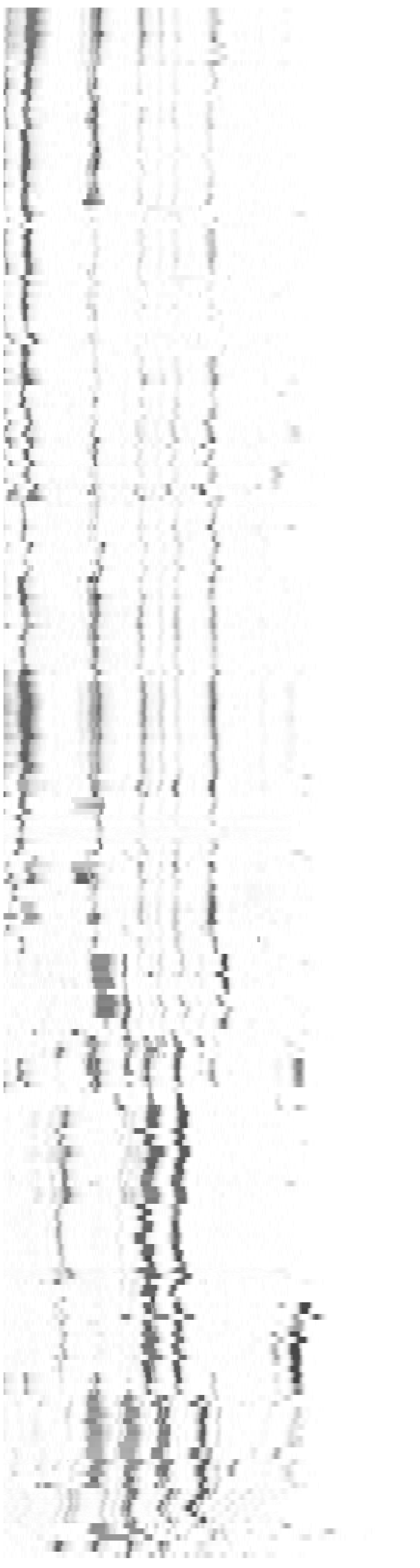
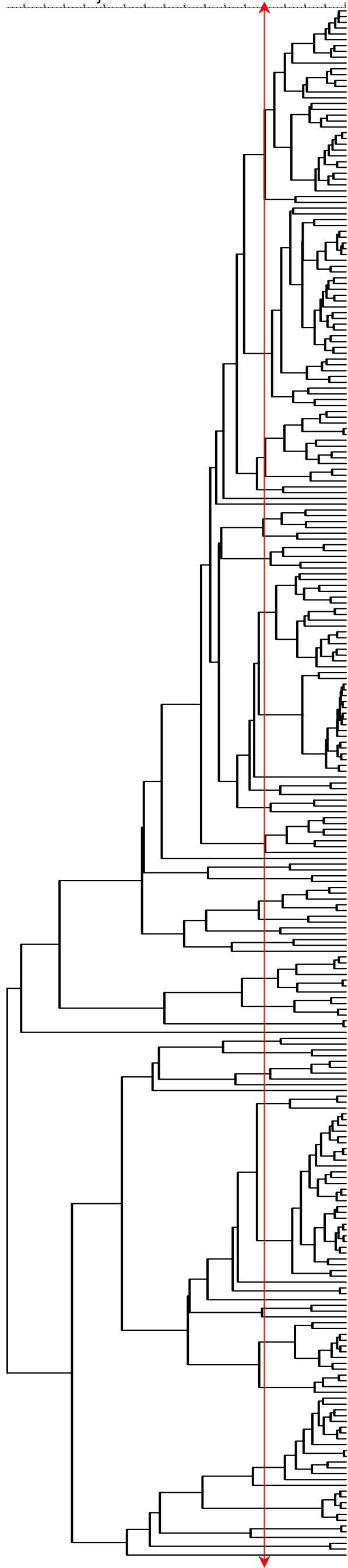
- (9) Davies A., Board R. 1998. The microbiology of meat and poultry. 346 pages.
- (10) Freyney J., Renaud F., Hansen W. and Bollet C. 2000. Précis de bactériologie clinique. Ed. ESKA. 1692 pages.
- (11) Korkeala H. and Mäkelä P. 1989. Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. Int. J. Food. Microbiol. **9**:33-43.
- (12) Korkeala H., Alanko T., Mäkelä P. And Lindroth S. 1989. Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. Int. J. Food Microbiol. **9**:237-247.
- (13) Lyhs U., Koort J., Lundström H. And Björkroth J. 2004. *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve. Int. J. Food. Microbiol. **90**:207-218.
- (14) Mäkelä P., Schillinger U., Korkeala H. and Holzapfel W.H. 1992. Classification of ropy slime producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. Int. J. Food Microbiol. **16**: 167-172.
- (15) Mayeux J. and Colmer A. 1961. Selective medium for *Leuconostoc* detection.
- (16) Rongguang Y, Ray B. 1994. Prévalence and biological control of bacteriocin producing psychrotrophic *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum packaged processed meats. J. food protect. **57**: 209-217.
- (17) Samelis J., Kakouri A., Georgiadou K.G and Metaxopoulos J. 1998. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. J. Appl. Microbiol. **84**:649-660.

- (18) Sawaya W.N., Abu-Ruwaida A.J., Hussain A.J., Khalafawi M.S. and Dasthi B.H. 1993. Shelf-life of vacuum-packaged eviscerated broiler carcasses under stimulated market storage conditions. *J. Food Safety*. **13**:305-321.
- (19) Shaw B.G and Harding C.D. 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** : 217-223.
- (20) Susiloto T., Korkeala H. and Björkroth K. 2002. *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell by day. *Int. J. Food. Microbiol.* **80**:89-97.
- (21) Von Holy A., Cloete T. and Holzapfel W. 1991. Quantification and characterization of microbial population associated with spoiled vacuum-packaged vienne sausages. *Food Microbiol.* **8**:95-104.
- (22) Yang R and Ray B. 1994. Prevalence and biological control of bacteriocine-producing psychrotrophic *Leuconostoc* associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.* **57**:209-217.
- (23) Yost CK. And Nattress FM. 2001. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**:368-372.

7. ANNEXE

Caractérisation moléculaire des isolats

issus de jambon



N°ADRIA	N°ADIV	Matrice	Nom pile base séquencée	%homologie	Genre	espèce
A0386	F835	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0387	F837	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0389	F804	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0390	F834	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0384	F833	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0388	F803	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0391	F853	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0395	F864	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0392	F864	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0377	F783	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0370	F856	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0373	F858	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0376	F859	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0375	F859	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0334	F706	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0342	A660	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0252	F859	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0265	F794	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0269	F812	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0255	F808	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0267	F808	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0335	F708	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0338	F708	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0331	F672	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0330	F671	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0318	F607	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0333	F673	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0337	A639	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0339	A642	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0396	G76	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0360	F872	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0332	F673	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0383	F787	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0381	F785	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0315	F654	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0482	A723	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0245	F780	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0319	F608	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0301	K513	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0303	K514	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0302	K513	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0296	K516	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0307	K516	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0295	F873	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0368	F858	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0372	F857	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0328	F619	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0272	K503	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0320	F606	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0313	K523	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0329	F619	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0338	A641	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0324	F614	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0355	G76	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0347	F879	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0343	F879	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0310	F606	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0317	F607	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0326	F618	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0325	F615	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0309	K517	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0312	K521	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0350	F882	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0397	F665	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0396	F665	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0219	F691	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0349	F803	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0439	K591	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0440	K591	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0298	K510	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0354	K514	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0519	K515	Leuconostoc jambon				
A0445	K584	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0444	K584	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0620	F605	Leuconostoc jambon				
A0329	F708	Leuconostoc jambon				
A0297	F509	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0243	F777	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0223	F690	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0255	F508	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0308	K517	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0300	K511	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0314	F632	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0526	A641	Leuconostoc jambon				
A0390	F693	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0204	E1168	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0212	F588	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0211	F588	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0221	F678	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0233	F699	Leuconostoc jambon				
A0214	F691	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0220	F676	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0227	F684	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0226	F683	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0225	F683	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0222	F680	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0228	F684	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0224	F691	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0274	F504	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0346	F603	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0275	F506	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0257	F600	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0268	F609	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0239	F773	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0240	F773	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0236	F770	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0232	F698	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0237	F772	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0244	F770	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0238	F772	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0243	F777	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0242	F776	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0241	F774	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0234	F697	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0264	F605	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0306	K515	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0404	F697	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0406	F699	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0403	F697	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0400	F691	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0402	F696	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0407	F699	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0405	F698	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0408	F695	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0401	F696	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0399	F699	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0358	G17	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0360	G75	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0409	F695	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0410	F833	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0384	F872	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0361	G75	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0335	F596	Leuconostoc jambon				
A0289	F696	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0231	F686	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0268	G2491	Leuconostoc jambon				
A0379	F784	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0390	F785	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0378	F784	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0203	E1168	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0246	F781	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0209	G254	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0210	G254	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0205	E1168	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0223	F697	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0204	F699	Leuconostoc jambon				
A0236	F699	Leuconostoc jambon				
A0230	F695	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0235	F688	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0227	F690	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0271	F781	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0280	F800	Leuconostoc jambon				
A0284	F673	Leuconostoc jambon				
A0489	F68	Leuconostoc jambon				
A0273	K503	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0276	K506	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0223	F671	Leuconostoc jambon				
A0369	F699	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0248	G87	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0270	F780	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0218	L1117	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0219	F677	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0217	L1116	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0549	A633	Leuconostoc jambon				
A0500	A634	Leuconostoc jambon				
A0548	A630	Leuconostoc jambon				
A0518	F699	Leuconostoc jambon				
A0216	L1114	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0215	L1114	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0434	A649	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0429	A632	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0430	A649	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0433	A634	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0438	A632	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0310	K519	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0311	K519	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0504	F693	Leuconostoc jambon				
A0505	F685	Leuconostoc jambon				
A0507	F687	Leuconostoc jambon				
A0513	F605	Leuconostoc jambon				
A0506	F686	Leuconostoc jambon				
A0499	F686	Leuconostoc jambon				
A0500	F687	Leuconostoc jambon				
A0501	F688	Leuconostoc jambon				
A0498	F685	Leuconostoc jambon				
A0493	F679	Leuconostoc jambon				
A0340	A642	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0430	A633	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0431	A633	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0416	F606	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0289	F788	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0278	F799	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0288	F800	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0281	F876	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0279	F799	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0260	F802	Leuconostoc jambon				
A0265	F608	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0296	F606	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0263	F784	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0251	F696	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0264	F613	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0516	F752	Leuconostoc jambon				
A0517	F758	Leuconostoc jambon				
A0283	F686	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0282	F884	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0281	F801	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0286	F814	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0293	F879	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0292	F878	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0287	F815	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0290	F870	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0289	F874	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0288	F873	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0281	F753	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0280	F813	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0294	F880	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0277	F798	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0206	E1168	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0208	G249	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0546	F612	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0322	F612	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0323	F613	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0341	A654	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0551	K553	Leuconostoc jambon				
A0561	G84	Leuconostoc jambon				
A0419	F675	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0480	G89	Leuconostoc jambon				
A0543	F604	Leuconostoc jambon				
A0446	K555	Lactobacillus-hétéro-Jambonne				
A0451	K561					