

PENETRATION DES BACTERIES DANS LA VIANDE

Jeanne FOURNAUD^x, Thérèse DEGAS^x, O. SCHMITT^x et J. SECHET^{xx}

^x INRA-JOUY, Laboratoire de Recherches sur la Viande, CNRZ, 78350 JOUY-EN-JOSAS - FRANCE

^{x x} Université de Bordeaux I, Laboratoire de Microbiologie, 33405 TALENCE CEDEX - FRANCE

INTRODUCTION

Pendant longtemps il a été admis que la contamination bactérienne n'advenait qu'en surface de la viande. Cependant, dès 1911 CHRETIEN avait montré pour les bactéries la possibilité de s'introduire dans la masse musculaire. Divers auteurs reprennent ces études en ensemençant artificiellement des surfaces de viande avec des bactéries connues. Seuls VANDERZANT et NICKELSON (1969), AYROULET-MARTIN et al (1976) se placent dans les conditions de la pratique. Ces derniers auteurs indiquent des taux de contamination à coeur relativement élevés. Aussi est-il apparu opportun de savoir s'il y avait, en plus de la pénétration des bactéries, croissance microbienne in situ et si l'epimysium ou le gras jouaient bien le rôle de barrière qui leur était attribué.

MATERIEL ET METHODES

I- Origine des viandes : les viandes proviennent de carcasses de bovins 48 heures post-mortem. Deux types d'essai sont réalisés

A- six muscles, M. Psoas major, M. Gastrocnemius pars interna, M. Flexor digitis pedis superf., M. Rectus Femoris, M. Tensor fascia latae et M. Biceps brachial, sont conservés 7 jours en chambre froide à 0-2°C ; cinq séries de 6 muscles sont stockées avec leur epimysium et leur couverture de gras pour certains, tandis que pour 5 autres séries de 6 muscles, gras et epimysium sont enlevés.

B- un morceau d'environ 1 Kg de M. semi membranous est placé sous vide et conservé 28 jours à 0-2°C.

II- Prélèvement des échantillons : le muscle est coupé en deux, perpendiculairement au sens des fibres musculaires ; le prélèvement bactériologique est réalisé selon la norme AFNOR (VO4501). A la suite une tranche de 3cm d'épaisseur est découpée pour l'étude histologique.

III- Analyses bactériologiques : elles sont réalisées selon les méthodes déjà décrites (FOURNAUD & al 1973)

IV- Histologie : juste après le prélèvement la tranche entière est traitée selon la technique de SCHMITT et DUMONT (1969) modifiée par DEGAS (1978). Des coupes de 10 μ , pratiquées avec un microtome dont la longueur de la lame de coupe atteint 30 cm, sont ensuite colorées par la méthode de gram modifiée.

RESULTATS

Les coupes histologiques de muscle dépourvu d'epimysium montrent qu'en début de croissance les bactéries, quelle que soit leur coloration de gram, forment en surface des colonies isolées. En grossissant, ces colonies se rejoignent sans se mélanger pour constituer un film bactérien continu (Photo 1). En même temps les bactéries envahissent les anfractuosités et pénètrent dans le muscle par l'intermédiaire du tissu conjonctif (Photo 1). Les germes qui s'infiltrèrent entre les fibres musculaires donnent alors naissance à des colonies bactériennes (gram + ou gram -) juste sous la surface, dans la couche superficielle du muscle.

En présence d'epimysium, les bactéries forment aussi des colonies qui s'incrustent et qui, de ce fait, dépassent peu ou pas du tout la périphérie. Ces colonies progressent dans la masse de l'epimysium suivant une ligne sensiblement parallèle à la surface (Photo 2). La croissance des bactéries peut s'accompagner d'une désorganisation du tissu conjonctif (Photo 2). Les bactéries, gram + ou gram - finissent par franchir l'epimysium et donnent naissance dans la couche musculaire sous-jacente à de nouvelles colonies (Photo 3). Il faut noter qu'avec ou sans epimysium, les colonies rencontrées dans la couche superficielle du muscle présentent comme à la périphérie une coloration homogène de gram + ou de gram - ou bien une juxtaposition de ces deux types sans qu'il y ait apparemment interpénétration (Photo 3). L'epimysium ne sert donc pas de barrière à la pénétration des bactéries dans le muscle. Ceci est confirmé par les dénombrements microbiens réalisés sur les prélèvements à coeur des muscles. Les contaminations apparaissent équivalentes avec ou sans epimysium sauf dans deux cas : Psoas major et Flexor digitis. Pour le premier, l'epimysium excessivement fin paraît favoriser la pénétration bactérienne ; pour le second au contraire, l'épaisseur relativement importante, ralentit malgré tout l'envahissement des tissus sous-jacents.

Dans le cas d'une couche de gras en surface de la viande, les bactéries s'y multiplient comme sur le muscle sans aponévrose. Cependant elles ne peuvent pénétrer dans les cellules adipeuses qu'elles sont obligées de contourner pour s'infiltrer dans la masse musculaire (Photo 4). Quel que soit l'état de la surface de la viande (muscle, epimysium, gras) on observe à la périphérie une domination de colonies à gram - alors que dans la couche sous-jacente il semble y avoir sensiblement une équivalence entre colonies à gram + et à gram -

A partir du film bactérien superficiel ou des colonies situées sous la surface, les bactéries envahissent la masse musculaire toujours en suivant le tissu conjonctif perimysium ou endomysium (Photo 5). La progression se fait sans discrimination apparente entre les diverses épaisseurs de la trame conjonctive. De plus, cette progression n'apparaît ni unidirectionnelle ni linéaire. Ceci explique qu'on ne peut sur un même plan suivre une colonie bactérienne du bord au coeur du muscle.

Dans la masse profonde du muscle les bactéries forment des colonies qui à leur tour remplissent tout le tissu conjonctif (Photo 6). Dans leur très grande majorité ces colonies sont à gram positif : Microbacterium thermosphactum dans le cas de conservation en présence d'air ou Lactobacillus pour les viandes conditionnées sous vide d'après les identifications des bactéries isolées. Pour les viandes conditionnées sous vide, à côté des lactobacilles, on note la présence de colonies à gram - d'enterobactéries. Sur le pourtour du muscle conservé en présence d'air les colonies à gram négatif appartiennent au groupe Pseudomonas - Acinetobacter.

L'ensemble de ces bactéries ne reste pas neutre dans le milieu de la viande. On observe en effet, au niveau des bactéries à gram - une attaque de la fibre musculaire qui se traduit d'abord par une désorganisation des fibrilles. Celles-ci ont tendance à perdre leur disposition parallèle et à se rompre avant que la strie Z disparaisse. La dégradation de la fibre peut être telle que de véritables cavités se produisent (Photo 7). Le bord de ce type de trou présente une surcoloration : la couleur normalement rose pâle des fibres due à la safranine se trouve renforcée et apparaît rose foncé. A un plus faible grossissement une coupe peut apparaître constellée de ces cavités à bords surcolorés (photo 8). Les colonies à gram positif (Microbacterium ou Lactobacillus) entraînent souvent elles-aussi une surcoloration.

L'ensemble de tous ces phénomènes n'apparaît pas de façon uniforme pour tous les muscles testés. Ainsi Psoas major est le seul muscle qui montre des cavités sur l'ensemble de la coupe. Pour Tensor fascia latae et Rectus femoris les cavités sont réparties dans une couronne le long de la périphérie. Ce dernier muscle se distingue d'ailleurs des autres car il ne présente pas de colonies à coeur.

DISCUSSION - CONCLUSION

Les observations effectuées sur les coupes histologiques de tranches musculaires confirment que les résultats des analyses bactériologiques dépendent du mode de prélèvement. La comparaison des diverses techniques, ringage, écouvillonnage, contact gelose, découpe d'une lamelle superficielle, indique que la découpe fournit toujours les dénombrements les plus élevés. Les différences constatées seraient dues, d'après NOTERMANS et KAMPELMACHER (1975) à un attachement des bactéries sur le substrat viande, l'adhérence étant réalisée grâce à une substance mucilagineuse produite par la bactérie. En réalité, il faut ajouter au phénomène de liaison viande-bactéries, la présence de microorganismes et de colonies microbiennes dans les anfractuosités de la surface ainsi que dans la couche immédiatement sous-jacente à cette surface. Ces implantations expliquent l'inefficacité des procédés de décontamination (liquides ou gazeux) mis en oeuvre sur des viandes rassises. En outre, dans le cas de conservation en présence d'air, la répartition des divers genres bactériens n'apparaît pas identique sur la surface et dans la couche superficielle. La fréquence moindre des bactéries à gram négatif (Pseudomonas-Acinetobacter) dans la partie sous-jacente à la surface tiendrait au besoin en oxygène de ces germes. Cependant l'épaisseur de viande concernée semble faible si bien que l'on peut se demander s'il n'y a pas là un phénomène inhibiteur de la viande sur ces bactéries, ou peut-être tout simplement compétition avec la myoglobine pour l'oxygène. Quoi qu'il en soit, ringage, écouvillonnage, contact gelose, ne peuvent conduire aux mêmes résultats quantitatifs et qualitatifs que ceux obtenus par découpe d'une lamelle superficielle.

D'après les travaux de VANDERZAN et NICKELSON (1969) et AYROULET-MARTIN et al (1976) diverses populations microbiennes sont retrouvées à coeur de muscle. Les observations d'histologie réalisées sur la tranche entière de muscle corroborent l'analyse bactériologique et précisent que perimysium et endomysium servent de voie d'accès. Ainsi que l'on montré GILL et PENNEY (1977), la progression ne dépend pas de la présence de cils sur la bactérie, mais contrairement à ce qu'affirment ces auteurs, elle ne dépend pas non plus du caractère protéolytique des germes. THUONG (1974) émet l'hypothèse que pendant les premiers temps de la conservation, les microorganismes seraient passivement entraînés par la phase liquide de la viande. Cependant la formation de colonies in situ ne peut se faire qu'au détriment de l'environnement donc par des bactéries qui dégradent les composés azotés. Les lactobacilles et Microbacterium possèdent une faible activité protéolytique (REUTER et al 1968, LAME 1976). La surcoloration de la safranine, colorant basique, autour de la colonie montre bien qu'il y a là élévation du pH donc protéolyse. La faible température de conservation (0-2°C) augmente peut-être aussi l'activité enzymatique, comme dans le cas de Pseudomonas fluorescens (PEDERSON et GUNDERSON 1960). Cependant la dégradation de la viande reste ménagée et ne peut être comparée à celle occasionnée par les bactéries putréfiantes qui arrivent à digérer localement le tissu protéique.

Ces changements de l'ultrastructure musculaire sous l'influence des microorganismes (BUCKLEY et al 1974, ABOUKHEIR 1975) ne peuvent pas toujours être décelés par des dosages biochimiques. Pour DAINTY et al (1975) la protéolyse est probablement due à l'activité des microorganismes, mais celle-ci ne peut être détectée, a priori, que lorsque la viande présente une surface poisseuse et une odeur douteuse. En réalité la dégradation de la fibre musculaire au cours de la conservation commence bien avant ces signes extérieurs. La pénétration des bactéries dans la viande dépend de la nature du muscle. Le muscle en tant que tel intervient aussi dans l'évolution des bactéries lors de la conservation sous vide (FOURNAUD ET VALIN 1977). Ceci suggère que les fonctions du muscle ou plutôt ses caractéristiques physiques et physicochimiques influent sur le devenir des microorganismes. On est donc en présence d'un substrat actif et de ce fait on ne peut plus considérer la viande comme un support nutritif inerte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOUKHEIR S., 1975 - Thèse Docteur Ingénieur NANCY
AYROULET-MARTIN M., FOURNAUD J., LAURET R., 1976 - 22ème Réunion Européenne des Chercheurs en Viande - MALMO
BUCKLEY D.J., GANN G.T., PRICE J.F., 1974 - J. Food Sci. 39, 825
CHRETIEN, 1911 - Cité par MONVOISIN (1923)- DUNOD Editeurs
DAINTY R.H., SHAW B.G., de BOER A., SCHEPS E.S.J., 1975 - J. appl. Bact. 39, 75
DEGAS Th., 1978 - D.E.S. BORDEAUX
ELMOSSALAMI E., WASSEF N., 1971 - Zbl. Vet. Med. B 18, 329
FOURNAUD J., SALE P., VALIN C., 1973 - 19ème Réunion Eur. des Chercheurs en Viande - PARIS
GILL C.O., PENNEY N., 1977 - Appl. Environ. Microbiol. 33, 1284
LAME, 1976 - Rev. Med. Vet. 127, 91
NOTERMANS S., KAMPELMACHER, 1975 - British Poultry Sci. 16, 351
PETERSON A.C., GUNDERSON M.F., 1960 - cités par ELLIOTT R.P. et MICHENER H.D., 1965 - U.S.D.A.
REUTER G., LANGNER H.J., SINELL H.J., 1968 - Fleisch 48, 170
SCHMITT O., DUMONT B.L., 1969 - Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 9, 123
THUONG L., 1974 - Thèse Phd. Cornell University
FOURNAUD J., VALIN C., 1977 - 24ème Réunion Eur. des Chercheurs en Viande - KULMBACH

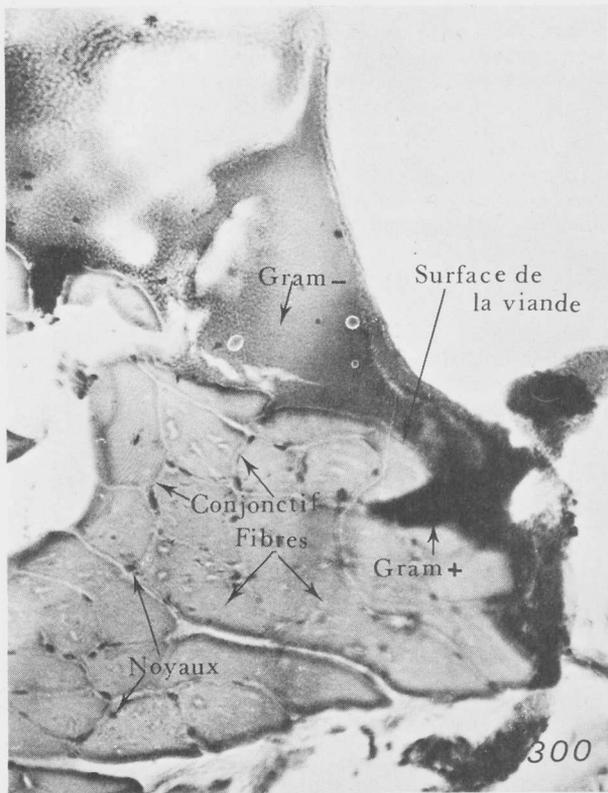


Photo 1 : Film bactérien en surface après 7 jours de conservation à 2°C en présence d'air.

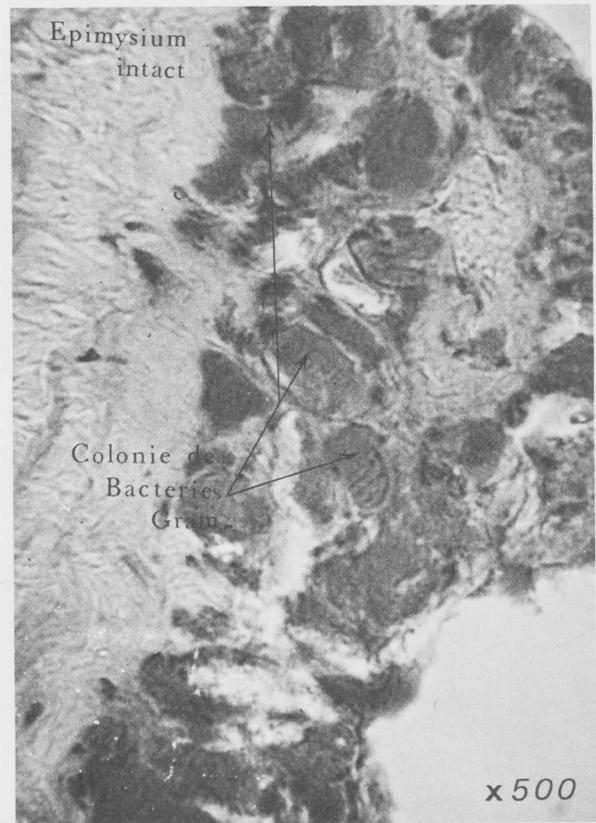


Photo 2 : Pénétration des bactéries dans un épimysium de *M. Flexor digiti pedis superf.* au cours d'une conservation en présence d'air de 7 jours à 2°C.

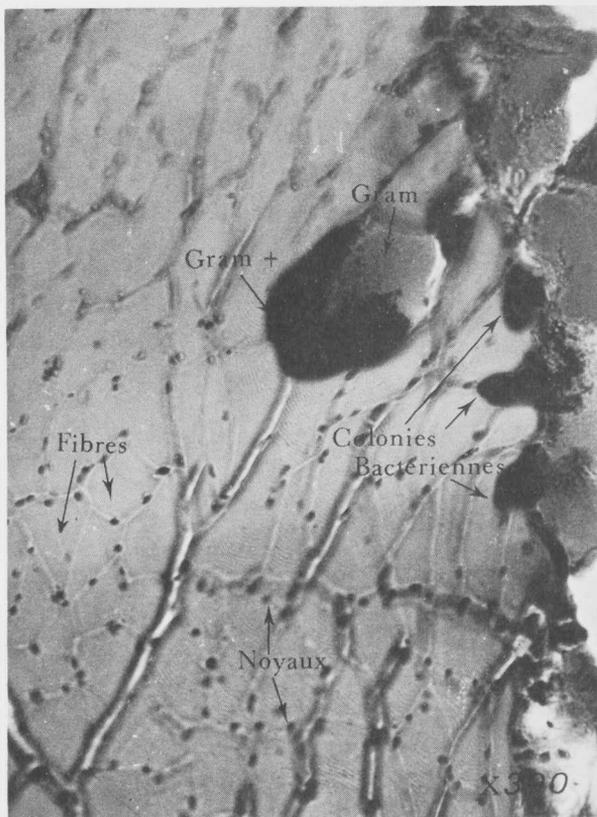


Photo 3 : Présence de colonies bactériennes sous l'épimysium de *M. Tensor fasciae latae* après 7 jours de conservation à 2°C. en présence d'air.



Photo 4 : Film bactérien en surface d'une couche de gras protégeant un *M. Flexor digiti pedis superf.* après 7 jours d'une conservation à 2°C. en présence d'air.

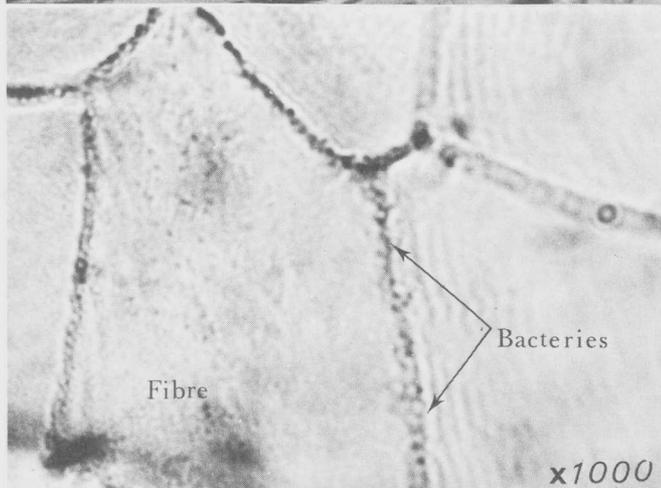
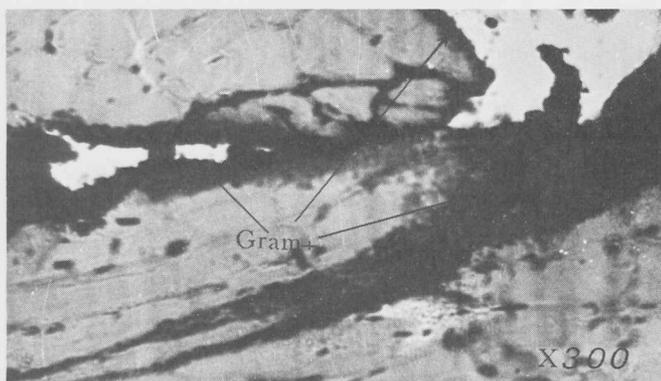


Photo 5 : Envahissement du conjonctif par des bactéries à Gram+ au cours d'une conservation de 7 jours à 2°C.

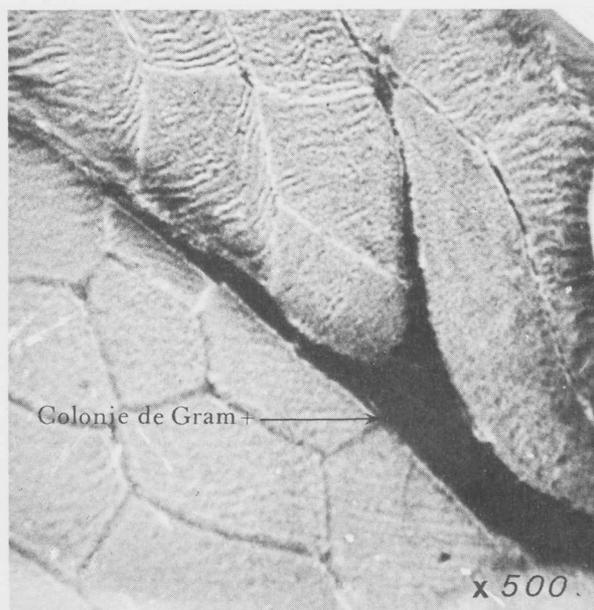


Photo 6 : Colonies de bactéries à Gram+ à coeur d'un M. Flexor digitis pedis superf. après 7 jours de conservation à 2°C en présence d'air.

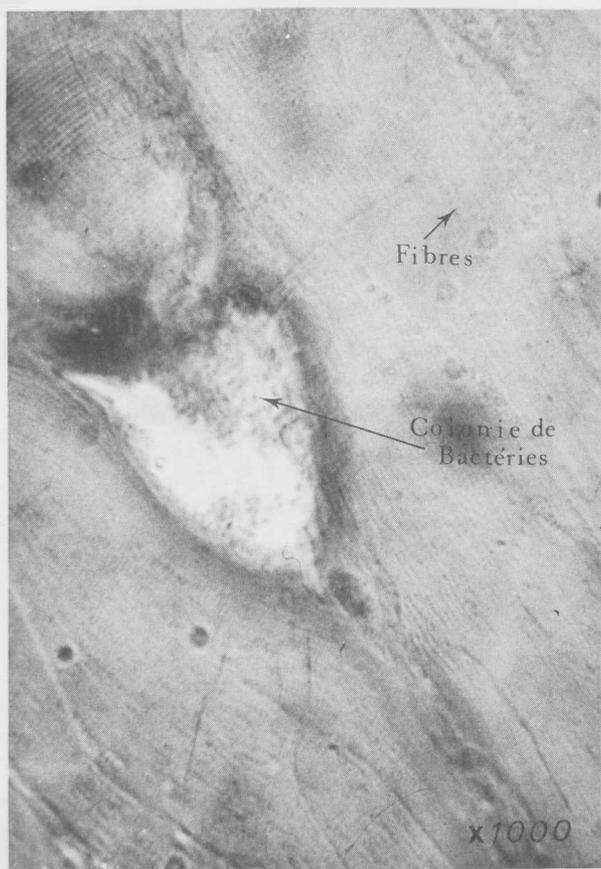


Photo 7 : Trou formé par des entérobactéries dans un M. Semi membranousus conservé 28 jours sous vide à 2°C.

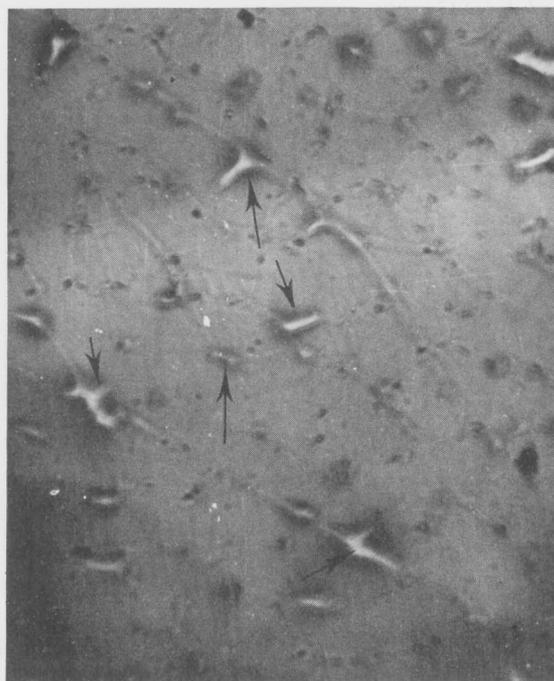


Photo 8 : Ensemble de cavités formées par les bactéries putréfiantes dans un M. Flexor digitis pedis superf. conservé 7 jours à 2°C en présence d'air.