

Chapitre 1. Analyses microbiologiques des aliments

-1-But de l'analyse

Les produits alimentaires contiennent généralement des microorganismes. Certains sont indispensables, car ils participent à la transformation de l'aliment en assurant le développement de la qualité organoleptique ou à sa conservation. D'autres microbes sont néfastes pour la qualité de l'aliment au niveau de la fabrication et de la conservation. Ce sont les germes banaux de contamination. Le 3^{ème} groupe comprend les microorganismes dangereux pour le consommateur, ce sont les germes pathogènes.

L'analyse des produits alimentaires peut être réalisée selon diverses optiques :

Contrôle industriel des matières alimentaires brutes.

Contrôle de fabrication au niveau d'une chaîne industrielle.

Contrôle des produits finis par l'industriel.

Contrôle des produits finis à l'usine ou au niveau de la distribution par le service de la Répression

Des Fraudes et du Contrôles de la qualité ou tout autre service officiel. S Contrôle des produits livrés à la consommation incriminés dans une intoxication par le Service d'Hygiène et d'Action Sanitaire.

Les analyses peuvent être effectuées sur les produits alimentaires et aussi sur les appareils, instruments, eaux de traitement et emballages.

-2- Echantillonnage et prélèvement en vue de l'analyse microbiologique

2-1- Echantillonnage : c'est le choix des éléments à analyser, 2 types de prises sont possibles :

- Le prélèvement d'éléments défectueux

- Le prélèvement au hasard d'éléments apparemment normaux pour le contrôle de la qualité. Dans ce cas, des méthodes statistiques sont normalement applicables.

Les méthodes d'échantillonnages rationnels sont difficiles. Le problème est particulièrement au niveau de l'analyse microbiologique, lorsqu'il s'agit de déceler une contamination particulière dans certaines pièces d'un lot très important Le choix des échantillons, le nombre et la fréquence des prélèvements dépendent de nombreux facteurs :

-Nature du produit.

-But de l'analyse : contrôle systématique des produits finis, contrôle de routine sur une chaîne de production, recherche de cause d'un accident. Les échantillons apparemment normaux doivent être choisis au hasard. Il existe des tables de prélèvement au hasard : elles consistent en une succession de nombres généralement

déterminés par tirage au sort. Il suffit de compter les éléments du lot et de prélever celui correspondant aux nombres.

-D'autres méthodes sont utilisées, par exemple si N est le nombre d'éléments d'un lot et n le nombre d'échantillons à prélever, on calcule $x = N/n$ et l'on compte à x, on prélève et ainsi de suite.

Les fréquences de prélèvements et analyses dépendent du niveau de production et du risque de

Contamination.

2-2- Techniques de prélèvements

Dans de nombreux cas, les prélèvements portent sur les éléments indivisibles (boîtes de conserves, bouteilles, etc.). Dans d'autres cas, ils doivent s'effectuer par prise d'une partie aliquote d'un élément de grande taille. Les techniques utilisées sont très variées

Prélèvement pour le contrôle microbiologique des surfaces : ils permettent l'étude de la flore présente sur la surface d'un aliment, le matériel de fabrication ou de stockage ; emballage, les murs et les sols des locaux, etc. Il peut se faire par écouvillonnage ou par rinçage.

Prélèvement pour le contrôle de l'air : s'effectue de plusieurs manières soit par exposition dans les salles de boîtes de Pétri ouvertes contenant une gélose ou encore par filtration sur membrane que l'on déposera ensuite dans un milieu gélose en boîtes de Pétri.

Prélèvement de produit liquide : le liquide est homogénéisé puis on prélève à l'aide d'une pipette ou d'une louche stérile.

Prélèvement de produit solide : qui sera prélevé à l'aide d'un scalpel ou myectome stérile.

2-3- Traitement de l'échantillon

Les échantillons doivent être soigneusement étiquetés (N° d'ordre ; date, heure, lieu précis ; modalités particulières de prélèvement ; indications utiles comme la T° de la salle, T° et pH de l'aliment, etc.). Le temps séparant le prélèvement et l'analyse doit être le plus court possible. Les V de l'échantillon ne doivent pas varier entre le prélèvement et l'analyse. Pour cela, les variations de T° sont limitées par l'emploi d'enceintes isolantes. Si cela est nécessaire un moyen de réfrigération peut être utilisé.

2-4-Préparation de l'échantillon

Toutes les analyses s'effectuent à partir d'une suspension liquide. La préparation des échantillons nécessite l'ouverture aseptique de récipients fermés puis leur homogénéisation. La solution mère est constituée par le produit brut lorsqu'il est liquide et par le produit de broyage dilué dans les autres cas.

3- Méthodes générales de l'analyse

L'analyse microbienne fait appel aux techniques d'examen microscopiques, de dénombrement (étude quantitative), d'isolement et d'identification des microorganismes (étude qualitative).

3-1-Etude quantitative

- Flore totale : correspond au dénombrement de la flore mésophile aérobie revivifiable (incubation à 30 °C pendant 48 à 72 h).

-La flore aérobie mésophile totale est formée de germes banaux de contamination. Ces germes n'agissent pas sur l'aliment et n'ont pas de répercussions du point de vue qualitatif et hygiénique qu'au-delà d'une certaine quantité. Le dénombrement de cette flore reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et peut donner une indication sur l'état de fraîcheur ou d'altération du produit.

- Flore particulières : comprend

1-Groupes physiologiques correspond à la flore fongique, flore anaérobie, flore thermophile ou psychrotrophe, flore indologène et putride, flore thermorésistante, etc.

2-Flore de contamination ou flore indicatrice : la présence de microorganismes indicateurs révèle la probabilité d'une contamination et qui est souvent une présomption de la présence de microorganismes pathogènes. Cette flore est représentée par les coliformes fécaux et E. coli, les streptocoques fécaux et les Clostridium sulfitoréducteurs.

3-2- Choix des techniques

Le milieu et les conditions de culture doivent être favorables aux germes recherchés.

- Numération en milieu liquide : appelée « technique de numération en tubes multiples » avec détermination du nombre le plus probable (NPP). Elle est généralement utilisée pour la flore indicatrice de contamination (coliformes et streptocoques fécaux) ou particulière.

- Numération sur milieu gélose. Très utilisée pour le dénombrement de la flore totale. Elle peu être utilisée pour la flore indicatrice de contamination ou particulière.

-Numération sur membranes. Utilisée pour les milieux liquides de fluidité satisfaisante et ne contiennent pas trop d'impuretés. Après filtration, la membrane est portée stérilement à la surface d'un milieu gélose.

3-3- Etudes qualitatives

Plusieurs types d'études qualitatives peuvent être réalisés au cours de l'analyse microbiologique.

1- Flore pathogène

Souvent des techniques d'enrichissement et de concentration sont nécessaires pour la mise en évidence des germes pathogènes car ils peuvent se trouver en faible quantité. Leur recherche peut se faire directement ou après enrichissement. Elle se fait sur milieu sélectif solide avec confirmation par l'identification de souches.

Les germes recherchés sont : les entérobactéries pathogènes (*Salmonella* et *Shigella*), les vibrions pathogènes, staphylocoques entérotoxiques, les germes sporulés pathogènes (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*).

4- Interprétation des analyses - Réglementation

L'analyse microbiologique a pour but de vérifier que la totalité d'un aliment correspond aux objectifs que l'on s'est fixé.

4-1- Respect de la qualité sanitaire et de la qualité commerciale

Pour définir la qualité hygiénique et commerciale, un certain nombre de « normes » ou « standards » existent. Sur le plan microbiologique, elles correspondent à l'absence de germes pathogènes ou de leurs toxines et à la limitation de la flore globale et des flores indicatrices.

Les normes varient en fonction des produits, du risque encouru (végétal, animal, cru ou cuit, destiné à être consommé cuit ou cru, etc.).

4-2- réglementation et normalisation

Dans la microbiologie alimentaire, les normes permettent d'améliorer les productions par la maîtrise des critères qualitatifs et sanitaires, participant à la sécurité des secteurs économiques. Les analyses permettent de contrôler l'absence des microorganismes dangereux et le niveau de la flore banale. Les résultats obtenus sont comparés aux « critères microbiologiques » établis par des commissions de spécialistes aux seins d'organismes internationaux ou nationaux.

La qualité microbiologique des aliments est soumise à diverses réglementations, au cours du contrôle qui est effectué par des laboratoires d'Etats ou agréés. Les analyses microbiologiques doivent être réalisées à l'aide de techniques spécifiques, exactes, précises, etc.

Les critères microbiologiques correspondent aux limites de conformité et de toxicité pour un produit. Ces critères afférents à un aliment doivent donner les limites jugées appropriées pour la denrée en question : quantité minimale à analyser pour la recherche de germes pathogènes ou de toxines, quantité maximale de germes « totaux » ou indicateurs tolérables.

Il existe de réglementations au niveau mondial comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Food and Agriculture Organization (FAO), le Codex alimentarius, etc. Une norme est un texte établi par un organisme reconnu, qui fournit des règles et des caractéristiques pour des produits ou des procédés. Il existe différentes normes comme les normes AFNOR, FAO, normes ISO, etc.

Chapitre 2. Le comportement des microorganismes dans les aliments

-A- Origine et comportement des microorganismes

-1- Introduction

Les microorganismes sont présents dans l'eau, l'air, le soi, l'Homme, les animaux et les végétaux, ce qui peut augmenter le taux de contamination des aliments. Ces contaminations peuvent être responsables de l'altération du produit (perte de la qualité organoleptique ou commerciale) ou des toxi-infections graves.

-2- Origine des microorganismes

Les aliments peuvent être des agents de transmissions de divers microorganismes ou de leur métabolite comme les toxines, susceptibles de provoquer des intoxications chez l'Homme. Ces microorganismes peuvent être groupés en fonction de leur origine la plus fréquente en deux : origine endogène (déjà présents dans les aliments avant leur préparation), et une origine exogène (contaminant les aliments au cours de la préparation, du transport, de l'industrialisation ou de la conservation, etc.).

2-1- Contamination endogène

Les aliments d'origine animale peuvent être contaminés au cours de leur préparation par des germes de l'organisme (contamination primaire ou initiale). Les animaux malades sont en principe éliminés du circuit alimentaire au cours des inspections par les vétérinaires. Ce sont les animaux porteurs asymptomatiques de microorganismes pathogènes qui constituent une source de contamination importante. Les réservoirs de germes sont spécialement les voies respiratoires, l'utérus, la mamelle et surtout le tube digestif.

2-1-1- Contamination par les microorganismes des barrières de surface

La peau, le plumage et les muqueuses sont riches en microorganismes tant que ces barrières existent, l'intérieur de l'animal est protégé, mais lors de l'abattage, ils peuvent contaminer les carcasses. Les germes rencontrés appartiennent souvent aux germes aux germes suivants : Micrococcus, Corynebacterium et des entérobactéries, s'il y'a eu contact avec les fèces. Les légumes sont porteurs de bactéries : Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, responsables d'altérations. Les bactéries lactiques (Leuconostoc, Pediococcus, etc.) sont présentes sur les feuilles. La présence des levures et des moisissures d'altérations ou encore phytopathogènes dépend de la qualité des eaux d'irrigation par exemple.

2-1-2- Contamination par les microorganismes du tube digestif

2-2-2- Contamination par des microorganismes de l'air et des poussières

L'atmosphère entourant les produits alimentaires contient un nombre élevé de particules. La contamination bactérienne atmosphérique est grave puisque généralement non

contrôlée. Elle est surtout constituée par des bactéries comme *Micrococcus*, des bactéries sporulées, des moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, etc.) et rarement des levures. Elle est d'autant plus importante pour les aliments non protégés par un emballage.

2-3- Evolution de la contamination au cours des traitements d'élaboration des produits alimentaires

Les pratiques de fabrication et de traitement des aliments assurent une réduction du nombre et du type de microorganisme. Malheureusement, les nombreuses manipulations auxquelles ils sont ensuite soumis tendent au contraire à favoriser les contaminations. La contamination des ingrédients, le mauvais nettoyage des surfaces des appareils, de l'équipement et du matériel d'emballage entraîne la contamination des produits. Deux éléments peuvent influencer l'évolution de la contamination 1^{ère} :

- Les caractéristiques physico-chimiques du produit et de l'environnement peuvent sélectionner l'installation d'une flore spécifique sur les aliments.
- Les processus industriels : la contamination des produits va se poursuivre puisque les produits vont être mis en contact avec le personnel, le matériel, les machines, les ingrédients, etc. les caractères du produit seront modifiés par les opérations du génie alimentaire (pelage, lavage, etc.). La température et le temps peuvent également influencer qualitativement et quantitativement la flore des produits.

2-3-1- Contamination par l'usine et son environnement

L'usine constitue une autre source de contamination supplémentaire. Elle est représentée par les agents suivants : air, eau, sol, le personnel, etc. Les flores commensales et pathogènes de l'Homme sont proches de celles des animaux. Elle peut provenir des personnes saines et malades ou encore de porteurs sains. La peau, les cheveux et autres pilosités sont riches en microorganismes (environ 10^4 germes /cm² pour la peau). Les germes incriminés sont surtout des staphylocoques, des streptocoques, etc. Les contaminations par les toux, éternuements, etc. Le contact du produit avec le matériel industriel, en particulier les surfaces poreuses, les outils et machines.

Les matières premières peuvent constituer un apport privilégié de microorganismes. Le traitement peut induire ou favoriser la dispersion d'une flore comme le hachage d'une viande, la mouture d'une graine, etc.

2-3-2- Contamination au cours des opérations technologiques

Les opérations technologiques vont souvent modifier la texture, le pH, la teneur en eau et parfois la composition de l'aliment comme la température élevée qui favorise les sporulés, les réfrigérés favorisent la flore psychrotrophes.

2-3-3- Contamination au cours du stockage, transport et de la conservation du produit

À la sortie de l'usine, les produits doivent être protégés par des emballages pour éviter toute contamination. Il faudra également les conserver à la bonne température. En effet, les remontées de T° favorisent le développement des germes d'altérations et pathogènes dans les produits réfrigérés. Les matériaux d'emballage utilisés ne permettant pas toujours de régler certains problèmes tels que : l'Aw qui doit être maintenir à 0,98-0,97 et celui de la tension d'oxygène. Pour y remédier, on induit les films d'emballage avec un polymère hydrosorbeurs, des absorbeurs d'O₂, des absorbeurs d'CO₂ et des antimicrobiens comme l'éthanol et le CO₂.

-3- Conclusion

A la fin du stade de fabrication, le produit fini contient une flore. Il a pu subir des contaminations successives de germes qui peuvent se développer mais aussi des traitements de stabilisation qui ont pu les réduire. Le but final est l'obtention d'un produit conforme afin d'éviter les altérations microbiennes qui nuisent à la qualité marchande, et les toxi-infections dangereuses pour la santé des consommateurs. Ce qui rend la tâche de l'industriel encore plus difficile, vu la taille des unités de production.

-B- Conditions de la multiplication des microorganismes dans les aliments

-1- Introduction

Un certain nombre de facteurs influe sur la sélection des espèces originellement présentes et favorisent ou inhibent la multiplication ou le métabolisme de la microflore, nous avons : la composition générale du milieu (source de carbone, d'énergie, facteurs de croissance). Cette composition est en relation directe avec certains paramètres tels que : le pH, Aw, Rh. La croissance microbienne est également affectée par d'autres paramètres propres à l'environnement dans lequel l'aliment est conservé ou stocké (T°, O₂, humidité, présence de certains inhibiteurs exogènes, etc.).

Il est intéressant de voir l'influence de chacun de ces paramètres sur la flore microbienne, ainsi que l'interaction de plusieurs d'entre eux. Les microorganismes qui vont proliférer dans l'aliment sont ceux qui résistent aux facteurs de sélection physico-chimiques, aux conditions usuelles de transport, de stockage et de conservation.

-2- Facteurs intrinsèques

2-1- Influence de la structure et de la composition du produit alimentaire sur la croissance microbienne

La structure physique d'un aliment affecte le déroulement et l'étendue de la décomposition. La présence de coques et de membranes de l'œuf, les téguments des

graines, la cuticule des végétaux et la peau des animaux intacts, empêchent la pénétration des microorganismes (au cours de la vie de l'animal et de la plante). A l'intérieur, la propagation des microorganismes est limitée par la présence de membranes cellulaires et du tissu conjonctif chez les animaux et de parois cellulodiques chez les végétaux. Mais le pelage et le broyage suppriment les enveloppes et favorisent le développement des microbes. Le lait étant dépourvu de tout moyen de protection, rend ce produit vulnérable. Les microorganismes se développent sur les aliments sont généralement des chimioorganotrophes, exigent de l'eau, source de carbone, des sels minéraux, de F02 et dans certains cas des facteurs de croissance. Les produits alimentaires contiennent les nutriments favorisant la multiplication des microbes. En général, c'est la composition qui sélectionne les flores.

Si un aliment consiste essentiellement en glucides, sa détérioration ne produit pas beaucoup d'odeurs. Des aliments comme le pain, les confitures et certains fruits, gâtent d'abord sous l'action de moisissures. Au contraire, si l'aliment contient des protéines et ou des graisses comme la viande et le beurre, sa détérioration s'accompagne d'odeurs infectes. La croissance des microbes sur un milieu modifie les conditions physico-chimiques qui peuvent devenir défavorables à sa multiplication. Sa croissance sera inhibée et d'autres microorganismes plus tolérants s'installent. Exemple : le lait cru à T° ambiante subit une fermentation acide par *Streptococcus lactis*. En devenant acide, le milieu devient défavorable à la multiplication de cette bactérie et qui sera remplacée par les *Lactobacillus* qui sont plus tolérants. Ils poursuivent la fermentation acide. Ils seront à leur tour inhibés et remplacés par les levures et les moisissures, qui sont plus acidophiles. Elles utilisent l'acide produit par les microbes précédents et de ce fait augmentent le pH, ce qui permet aux bactéries protéolytiques d'intervenir. La présence des facteurs de croissance influent sur la sélection des espèces et favorisent la multiplication et le métabolisme de la microflore par rapport à une autre.

2-2- Influence du pH du milieu sur la croissance microbienne

Le pH a une grande incidence sur l'équilibre ionique du milieu donc sur les réactions biochimiques et donc sur le métabolisme des microbes.

2-2-1- Comportement des microorganismes au pH

La plupart des bactéries se développent à des pH compris entre 4,5 et 9,0 avec un optimum proche de la neutralité (6,5 à 7,0). Il existe cependant des exceptions telles que les bactéries acétiques qui supportent un pH < 3,5. Les levures dont l'optimum se situe entre 4,0 et 6,0, arrivent à supporter des pH extrêmes allant de 2,0 à 9,0 et les moisissures sont ainsi considérées comme acidophiles facultatifs. Généralement, les bactéries pathogènes sont incapables de se développer à un pH < 4,5, ce qui fait que les aliments

acides sont peu dangereux. Chez les bactéries sporulées, le taux de sporulation, la thermorésistance des spores et le taux de germination dépendent également du pH. Le pH n'est pas le seul à intervenir. La nature de la molécule impliquée joue un grand rôle.

Tableau 1. pH de croissance de quelques micro-organismes

Microorganisme	Minimum	Optimum	Maximum
Moisissures	1,5/3,5	4,5/6,8	8/11
Levures	1,5/3,5	4,0/6,5	8/9,5
Bact acétiques	2,0	5,4/6,3	9,2
Bact lactiques	3,2	5,5/6,5	10,5
Entérobactéries	5,6	6,3/7,5	3,0
Staphylocoques	4,2	6,8/7,5	9,3

2-2-2- Mode d'action du pH

Il agit sur :

- La disponibilité des nutriments. Ainsi à pH acide, les ions Mg^{+2} forment des complexes et à pH basique, ce sont les ions Ca^{2+} , F^{+2} qui forment des complexes et deviennent insolubles et donc non disponibles. Ces ions jouent le rôle de cofacteurs d'enzymes.
- La perméabilité des membranes cytoplasmiques
- Les activités enzymatiques extracellulaires et à un moindre degré sur les activités intracellulaires.

En général, les microbes peuvent se protéger contre le pH extracellulaire grâce à la membrane cytoplasmique qui devient moins perméable aux ions H^+ et aussi à l'effet du tampon du cytoplasme.

Remarque :

Le stress provoqué par une baisse de pH entraîne des réactions de défense de la cellule. Il y'a synthèse de protéines qui peuvent augmenter l'hydrophobicité de la membrane et protègent la cellule. Ces protéines sont localisées généralement au niveau de l'espace périplasmique.

2-2-3- pH des aliments

Généralement, le pH des produits camés est proche de la neutralité. Après l'abattage de l'animal, le pH du muscle diminue dû à une production de lactate à partir de glycogène. Si la carcasse est entreprise à l'air, il y' a développement de *Pseudomonas* (76 % à pH 5,4 et 88 % à pH 6,6). Si la conservation de la viande se fait sous vide, il y'aura installation des bactéries lactiques (90 % à pH normal et 60 % PH élevé).

Le pH des poissons est plus élevé et a tendance à augmenter ai cours de la conservation dû à l'installation de la flore de putréfaction qui libère de NH_3 et des aminés. Pour les œufs,

le pli du blanc est alcalin et augmente au cours de la conservation et peut atteindre 9,0, ce qui limite toute croissance microbienne.

Les fruits ont un pH bas, ce qui sélectionne le développement des moisissures et des levures. Quand aux légumes, dont le pH est proche de la neutralité, il favorise le développement des bactéries et spécialement celui de la flore psychrotrophe responsable des altérations au cours de la réfrigération.

Tableau 2. pH de quelques produits alimentaires.

Produit alimentaire	pH	Produit alimentaire	pH
Bœuf	5,3/6,2	Pomme de terres	5,4/6,2
Poisson	6,5/6,8	Oignons	5,3/5,8
Beurre	6,1/6,4	Tomates	4,2/4,9
Lait frais	6,3/6,5	Pommes	2,9/3,3
Poulet	5,8/6,4	Citrons	2,2/2,4

2-3- Influence de l'activité de l'eau (A_w) sur les microorganismes

L'activité de l'eau (A_w) d'un aliment est définie comme le rapport des pressions partielles d'eau de la solution et de l'eau pure (P_s/P_e). Elle est comprise entre 0 et 1. Elle est inversement proportionnelle à la pression osmotique de l'aliment. Une baisse d' A_w entraîne une augmentation de la pression osmotique (pression osmotique est la pression hydrostatique qu'il faudra exercer sur une solution pour équilibrer la diffusion de H_2O pure à travers une membrane semi perméable).

L'eau et sa disponibilité affectent la capacité qu'ont les microorganismes de coloniser les aliments. On peut rendre l'eau non disponible même si elle est présente, en ajoutant des solutés comme le sel ou le sucre.

2-3-1- Comportement des microorganismes

A une A_w comprise entre 0,98 et 1,0, presque tous les microbes se développent et comme la croissance bactérienne est plus rapide que celle des levures et des moisissures, elles deviennent la flore prédominante. A $A_w < 0,95$, les bacilles à Gram négatif sont remplacés par des cocci et des lactobacilles, qui sont un peu osmotolérants. Généralement, le stress osmotique produit une perte d'eau (plasmolyse) qui va perturber les activités métaboliques. Avec une $A_w < 0,87$ (sirop, fruits confits), la croissance des bactéries et de la plupart des levures est inhibée ; seuls les moisissures et quelques levures, dites osmopliles pouvant se développer. Ces dernières sont de tous les microorganismes, ceux qui tolèrent A_w la plus basse 0,60. On appelle xérophiles, les microbes se développant sur les produits secs (quelques moisissures) ($A_w < 0,75$) et les halophiles se développent sur les produits salés. L'abaissement de l' A_w s'accompagne d'une diminution du taux de croissance bactérienne (A_w optimale est de 0,990 et 0,995).

Tableau 3. Aw minimum de croissance.

Bactéries	>	0,910	Levures	>	0,87
<i>Acinetobacter</i>		0,990	<i>S. cerevisiae</i>		0,90/0,94
<i>C. botulinum</i>		0,970	Levures osmophiles		0,62
<i>E. coli</i>		0,950	Moisissures		0,70
<i>Salomonella</i> sp.		0,950	<i>A. flavus</i>		0,78
<i>Bacillus subtilis</i>		0,900	<i>Mucor</i>		0,80/0,90
Bact halophiles		0,750	Mois, xérophiles		0,70
<i>S. aureus</i>		0,860			

2-3-2- Mécanisme d'action

Le stress osmotique entraîne une fuite d'eau et la cellule doit réagir par :

- Accumulation des solutés compatibles avec le métabolisme
- Elle synthétise ou importe des osmoprotecteurs pour éviter la dénaturation des macromolécules. Elle accumule le glutamate et le K^+ comme une 1^{ère} réaction au choc osmotique chez les bactéries à Gram +, G- et les moisissures. Le 1^{er} est importé ou synthétisé à partir de α -cétoglutarate ou de glutamate et le 2^{ème} est importé par son propre système de transport.

2-3-3- Aw des aliments et développement microbien

La plupart des produits frais (fruits, légumes, viande, lait et les poissons) ont une Aw variant de 0,97 à 0,996. ils permettent le développement des bactéries sauf les fruits qui favorisent celle des moisissures et des levures. Le pain, les pâtisseries favorisent celle des moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, etc.).

Tableau 4. Aw de quelques produits alimentaires.

Produit alimentaire	Aw	Produit alimentaire	Aw
Bœuf	0,90/0,98	Tomate	0,991
Poisson	0,994/0,990	Pomme	0,980
Lait	0,995	Raisin	0,986/0,963
Carotte	0,989/0,983	Citron	0,984
Pomme de terre	0,985	Orange	0,988
Concombres	0,998/0,983	confiture	0,800/0,750

2-4- Influence de l'oxygène sur les microorganismes

Le potentiel d'oxydoréduction de l'aliment influe aussi sur la détérioration. Il dépend de la nature des substances contenues dans le milieu (oxydantes ou réductrices), de l'aération et de la texture du produit. L'O₂ augmente le potentiel redox et en jouant le rôle

d'accepteur d'électrons peut provoquer un stress oxydatif pouvant entraîner la mort par formation de peroxyde, de superoxyde, etc.

2-4-1- Effets de l'O₂ et ses dérivés sur le métabolisme microbien

Les formes actives de l'O₂ sont représentées par le superoxyde (O₂⁻), le peroxyde (H₂O₂) et l'hydroxyle (HO⁻). Ces radicaux, s'ils ne sont pas détruits par les peroxydases, provoquent des oxydations des constituants cellulaires» qui touchent principalement les lipides membranaires (modification ou coupure des chaîne d'acides gras, ce qui provoque des désordres et entraîne parfois la lyse cellulaire).

- inactivation des protéines et surtout des enzymes
- Oxydation des acides nucléiques, action au niveau de l'ADN est souvent mortelle

2-4-2- Réactions des cellules stressées

Les aérobies (stricts et facultatifs) réagissent par la production de superoxyde dismutase et de catalase qui permettent à la cellule de résister au peroxyde formé. Certains microbes synthétisent des enzymes antioxydants.

- Les anaérobies stricts sont dépourvus de catalase et de superoxyde dismutase donc O₂ est toxique pour la cellule. Mais certaines espèces possèdent des molécules antioxydants arrivent à supporter des traces d'O₂
- Les bactéries lactiques étant catalase - possèdent d'autres systèmes pour lutter contre le stress oxydatif. Les entérocoques et les lactocoques possèdent une peroxydase flavinique. *Lactobacillus plantarum* possède une pseudocatalase. D'autres accumulent des ions Mn²⁺ qui en s'oxydant éliminent les radicaux libres.

2-4-3- O₂ et flores microbiennes dans l'aliment

- La surface des aliments humides et compacts où Rh > 0 (Ex : viande, poisson, lait) permet la pousse e la flore aérobie mésophile ou psychrotrophe. En profondeur Rh < 0, il permet le développement des flores bactériennes de surissement (flore lactique) ou putréfiant (*Clostridium*).
- Les produits végétaux frais et entiers sont vivants et respirent donc le Rh > 0 dans les tissus. Ce qui permet le développement des moisissures sur et dans les fruits et les légumes et les bactéries aérobies sur et dans les légumes. Le broyage et cuisson désaère ces produits d'où le développement des levures dans les jus de fruits.
- Les produits secs : farines et poudres de lait aérées permettent le développement des moisissures et des bactéries aérobies.
- Les dérivés carnés, particulièrement les bouillons, ont souvent des potentiels d'oxydoréduction faibles. Ces dérivés, contenant des acides aminés, des peptides et des facteurs de croissance sont le développement des anaérobies comme *Clostridium*.

3- Facteurs extrinsèques

3-1- La température :

On distingue différents cas

- Les psychrophiles et les psychrotrophes : les 1^{er} sont les microorganismes du froid. Ils se développent à 0 °C en 1 ou 2 semaines. L'optimum est de 15 °C. Ils sont peu rencontrés en milieu alimentaire, Ex : Micrococcus cryophilus.

Les 2nd sont capables de se développer à 0 °C mais moins rapidement que le 1^{er} groupe. L'optimum varie de 25 à 30 °C et le maximum est de 35 °C. Leur croissance est plus lente que celle des mésophiles. Ils se développent sur les aliments conservés à basse T°, Ex : Achromobacter, Flavobacterium, Pseudomonas., les moisissures, etc.

Il y'a peu de psychrotrophes pathogènes, Listeria monocytogenes pathogène responsable d'infections et Bacillus subtilis qui peut produire des toxines dans les denrées réfrigérées.

- Les mésophiles : la majorité des microorganismes se développent entre 15 et 45 °C avec un optimum à 37 °C. leur taux de croissance est élevé. Ils se développent sur les aliments laissés à T° ambiante et sur les aliments réfrigérés mais dont la chaîne de froid a été rompue. La majorité des bactéries d'altérations et pathogènes sont des mésophiles, exemples : entérobactéries, Bacillus, bactéries lactiques, etc.

- Thermotrophes et thermophiles : les 1^{er} ne forment pas de spores, thermostables, ne poussent pas à 15 °C et supportent des T° de 75 à 80 °C. leur optimum est proche de 50 °C, exemple : quelques bactéries lactiques comme Streptococcus thermophilus et Lactobacillus helveticus, etc.

- le 2nd groupe est formés de bactéries sporulées appartenant à Bacillus et Clostridium. L'optimum se situ aux environs de 55 °C et 65 °C, ne poussent pas à 37 °C. Les spores résistent plusieurs à 100 °C e⁺ quelques minutes à 130 °C, exemple : Clostridium thermosaccharolyticum.

Le froid ralentit et bloque le métabolisme microbien, sans habituellement tuer les microorganismes. Mais, la congélation (surtout si elle est lente) peut entraîner une forte mortalité.

3-1-1- Effets de la température : agit sur

- L'état physique de l'eau
- Vitesse de la réaction enzymatique
- La plasticité des membranes sud cytoplasme
- Dénaturation des protéines, des acides nucléiques, etc.

Les températures en dessous ou au dessus entraînent le stress thermique

3-1-2- Adaptations des microorganismes au stress thermique

Le stress thermique provoque des perturbations de la croissance, des lésions de la paroi et de la membrane. La cellule réagit par une synthèse de protéines du choc thermique. La

synthèse des protéines du choc thermique est induite à une T° de 35 et 45 °C pour les mésophiles et de 60 °C pour les thermophiles. Ainsi les bactéries possèdent un pouvoir d'adaptation. Un choc physico-chimique sublétal entraîne la mise en place de dispositifs physiologiques temporaires assurant la survie dans le nouvel environnement. Elles synthétisent des protéines de stress (HSP : heat shock proteins). Ces protéines limitent l'agrégation des protéines en conditions dénaturantes et favorisent leur renaturation en condition normales.

Le choc froid provoque aussi la synthèse de protéines. Ces protéines protègent les protéines fonctionnelles ou les réparent.

Les germes thermophiles possèdent certaines enzymes ayant une thermostabilité supérieure aux mésophiles du même genre. La membrane cytoplasmique jouant un rôle important dans la vie de la cellule et ses fonctions dépendent en partie de son intégrité et de sa fluidité. Sa composition en acides gras est variable. Une souche de Alteromonas mésophile possède 28 % d'ac gras insaturés, lorsqu'on incube à 10 °C. Son taux d'ac gras insaturé passe à 52 %. Alors que Thermus, bactérie thermophile présente 13 % d'ac gras insaturé, en l'incubant à 70 °C, réagit en abaissant son taux d'ac gras insaturé à 0,2 %.

3-2- Humidité relative de l'environnement

Une atmosphère ambiante très humide entraîne une prolifération des microorganismes à la surface des aliments car elle apporte l'eau nécessaire au développement de ces derniers.

3-3- Inhibiteurs

Plusieurs produits chimiques sont capables d'inhiber la croissance des MO. Elle s'effectue soit par inactivation d'un métabolite vital, par détérioration des protéines ou la destruction de certaines parties cellulaires du microbe.

Certains de ces composés chimiques sont parfois sélectifs, c'est-à-dire qu'ils empêchent la croissance de certains MO mais n'affectent pas d'autres MO.

De nombreux aliments contiennent des substances antimicrobiennes naturelles, parmi lesquelles des inhibiteurs chimiques complexes et des enzymes. Les œufs sont riches en lysozyme, une enzyme lyrique pour les parois des bactéries à G+. Les herbes et les épices contiennent souvent des substances antimicrobiennes. La sauge et le romarin sont deux des épices les plus antimicrobiennes. L'ail contient l'allicine

-A- Les bactéries

-I- Introduction

Les bactéries intéressant la microbiologie alimentaire sont des hétérotrophes. Certaines sont des saprophytes vivant librement dans la nature, d'autres sont des commensales de l'homme et des animaux. Certaines espèces sont des parasites et possèdent un pouvoir pathogène. Parmi les espèces pathogènes, certaines ont un pouvoir infectieux qui agit par envahissement de l'hôte (infection) alors que d'autres ont un pouvoir toxigène (libèrent des toxines dans l'aliment : intoxication) et des espèces à caractères mixtes qui provoquent des toxi-infections. Quelques bactéries agissent par transformation du substrat qu'elles rendent toxique, produisant ainsi des intoxications. Les bactéries utiles sont essentiellement des agents de fermentations lactiques, acétique, propioniques, etc.

-II- Les bactéries lactiques

-II-1- Introduction

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble hétérogène de bactéries dont certains genres comme les lactobacilles et les bifidobactéries font partie de la flore commensale. Depuis, longtemps, elles sont employées pour la fabrication et la conservation des aliments. Elles sont utilisées sous forme de levains artisanaux. La plupart des bactéries lactiques participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés, pour lesquels elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires de l'aliment. Elles sont impliquées dans les phénomènes d'altérations de certains aliments. Leur rôle pathogène est réduit (certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus*).

-II-2- Définition

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène non pathogènes qui sont classées aux USA comme microorganismes « GRAS » (Generally Recognized As Safe) qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires et qui témoignent de leur parfaite innocuité. Elles sont utilisées pour la préservation des aliments ainsi que pour l'amélioration de leurs qualités structurales et organoleptique. Cependant, peu de bactéries lactiques survivent à passage du tractus intestinal. Ce groupe a été défini la 1^{ère} fois par Orla-Jensen en 1919.

Les bactéries lactiques ont pour principale caractéristique d'être : à Gram+, généralement, immobiles, asporulées, anaérobies mais aéro-tolérantes ou micro-aérophiles et de ne posséder ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysant faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles.

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui en utilisant des glucides, produisent soit exclusivement du lactate (homolactique), soit du lactate et de l'acétate (hétérolactique facultative), soit du lactate, de l'acétate ou de l'éthanol et de CO₂ (hétérolactique stricte).

-II-2-1- Origine

Les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents mais riches en composés organiques. Elles sont isolées d'environnements naturels végétaux (plantes, fruits), animaux et humain (cavité buccale, tractus intestinal, fèces, lait, etc.). On les trouve généralement associées à d'autres microorganismes dans de nombreux produits de fermentation naturelle animaux et végétaux : laits fermentés (fromage, beurre...) viandes fermentées (saucissons, jambon...), boissons alcoolisées à base de fruits (vins, bière...), légumes et fruits (choucroute, concombres...).

-II-2-2- Taxinomie et classification

Les bactéries lactiques renferment 12 genres : *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*

Genre *Streptococcus* : cellules sous forme de coques arrangées en général en chaînes. La fermentation est homolactique. Il comprend des espèces pathogènes pour l'homme (*S. pyogenes*) ou pour les animaux ou encore saprophyte de la cavité orale (*S. salivarius*). De nombreuses espèces sont utilisées dans les industries de fermentation lactique (laiterie, beurrerie, fromageries, saumures et salaisons). Ce sont des agents d'acidification et de coagulation du lait en fromagerie.

Genre *Lactococcus* : cocci comme *Lactococcus lactis* avec ces 3 sous espèces (*Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*), *Lc. raffinolactis*... Ils sont isolés du lait et des produits laitiers, des végétaux.

Genre *Leuconostoc* : cellules en forme de coques s'associant en paires ou en chaînettes, hétérofermentaire, produisant du lactate, de l'éthanol, du CO₂. Il est mésophile et se caractérise par la production de citrate, de diacétyle et par la synthèse de dextrane extracellulaire en présence de saccharose. On distingue les espèces suivantes : *Ln. Cremoris*, *Ln. mesenteroides*, *Ln. dextranicum*, *Ln. lactis*, *Ln. paramesenteroides*, et *Ln. oenos*. Elles ne sont pas pathogènes mais responsables d'accidents de fabrication dans les produits alimentaires acides et sucrés, ou les végétaux. Ils facilitent l'ouverture du fromage bleu par production de CO₂ et interviennent dans la fermentation des végétaux (olives, choucroute...). La dernière espèce est responsable de la fermentation malo-lactique.

Genre *Pediococcus* : cocci plus exigeantes en facteurs de croissance et anaérobies facultatifs. De nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles. Il est homolactique et c'est un contaminant des végétaux et agent de dégradation en brasserie (*P. cerevisiae*).

Genre *Lactobacillus* : des bacilles asporulés souvent allongés, en paire ou en chaînettes et sont catalase-. Certaines souches possèdent une pseudocatalase. Ce sont des aérotolérants mais la croissance est meilleure en anaérobiose et préfèrent les conditions acides (pH 5.5-6.5). Leur GC% varie de 32 à 54 mol%.

Des espèces sont homolactiques et d'autres sont hétérolactiques (en plus du lactate, produisent des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂). Ils exigent de nombreux facteurs de croissance et selon leur type fermentaire et la température optimale de croissance, on distingue : *Thermobacterium*, *Betabacterium* et *Streptobacterium*. Ils sont isolés de produits laitiers et carnés et du fourrage. Certaines espèces provoquent le verdissement de la viande. D'autres altèrent les jus sucrés ou encore les produits conservés par les acides.

Les lactobacilles sont aussi utilisés dans l'industrie fromagère, dans la fabrication de la choucroute. L'arôme du yaourt est dû à *L. bulgaricus* et d'autres comme *L. plantarum* et *L. brevis* interviennent dans l'affinage des fromages.

Ces dernières années, les génomes d'une vingtaine de bactéries lactiques ont été entièrement séquencés. La taille de leur génome varie de 1.8 Mégabases (Mb) pour *Oenococcus oeni* à 3.3 Mb pour *Lactobacillus plantarum*.

II-3- Actions des bactéries lactiques dans les aliments

Les bactéries lactiques ont 2 rôles principaux dans les aliments :

- Un rôle technologique (positif)
- Un rôle négatif : altération des denrées alimentaires.

A- Propriétés technologiques

La flore lactique participe aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires.

✓ Rôle sur la structure et la texture : dans les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé à texture ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé) selon les bactéries lactiques. L'acidification des aliments comme les légumes, les jus de fruits présente plusieurs avantages : fait précipiter les protéines ce qui rend les aliments plus digestes et active la vitamine C. La production d'exopolysaccharides par ces bactéries évite de rajouter des additifs tels que les texturants et les épaississants lors de la production de yaourt. Ces EPS augmentent de ce fait la texture et la viscosité.

✓ Rôle sur les caractéristiques organoleptiques : par production de lactate et autres acides donnent un caractère acide au produit, le diacétyl et l'acétaldéhyde responsables des saveurs caractéristiques du beurre et du yaourt. Les composés issus de la protéolyse, des activités lipolytiques sont responsables de la formation d'arômes lors de l'affinage des fromages.

✓ Rôle sur la conservation : elles inhibent les autres bactéries par :

Le processus d'acidification [pH 4,0 et 4,5 (yaourt), pH 4,8 (choucroute), pH 4,5 à 5,3 (saucissons)] a des conséquences d'ordre physico-chimique et microbiologique. Cette accumulation d'acide lactique participe à la saveur des aliments fermentés, un abaissement du pH du milieu et une limitation des risques de développement des flores pathogènes et d'altérations.

- Production de bactériocines : qui sont des peptides antimicrobiens synthétisés par de nombreuses souches comme la nisine produite par *Lactobacillus lactis*. Ces bactériocines ont un spectre étroit envers des espèces pathogènes. Elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Elles sont inactivées par les protéases et sont thermostables.

- Production d'autres substances inhibitrices comme H_2O_2 et le diacétyl peut inhiber des bactéries à Gram-.

✓ Rôles sur les caractéristiques nutritionnelles : les laits fermentés sont reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. L'acide lactique produit par ces bactéries rééquilibre la balance acide-base, et par là les échanges d'oxygène et des minéraux avec les cellules. Par ses qualités antiseptiques, le lactate protège la muqueuse intestinale des germes pathogènes, en plus de son effet régulateur sur la digestion. Des études réalisées ont démontré des effets sur l'activation du système immunitaire. Ainsi l'ingestion d'un mélange de

Bifidobacterium bifidum et de *Lactobacillus acidophilus* entraîne une augmentation des lymphocytes B dans le sang.

B- Rôles dans l'altération

La flore lactique peut altérer les denrées alimentaires et, spécialement ceux conditionnés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Ces altérations présentent une difficulté pour les industriels de l'agroalimentaire, avec des conséquences sensorielles négatives pour le consommateur. Les principaux défauts observés sont :

- ✓ Production d'acide lactique et autres acides organiques dans le lait cru maintenu à T° ambiante. Cette acidification non contrôlée est responsable de son altération.
- ✓ Production de CO₂ par les hétérolactiques surtout sur les viandes conservées sous vide suite à une décarboxylation des acides aminés, d'où gonflage de l'emballage.
- ✓ Production de H₂O₂ responsable du verdissement des produits carnés conditionnés sous vide. La contamination en germes verdissants peut également apparaître après cuisson via des lactobacilles (*Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*), *Leuconostoc*, *Weissella* et certains *Pediococcus* et *Enterococcus*.
- ✓ Production de produits aromatiques : certaines de leurs protéases sont responsables de la formation de peptides amers particulièrement en production fromagère. Certaines lipases responsables de l'oxydation des lipides donnent naissance à des acides gras volatiles, cétones responsables des goûts désagréables du beurre, des crèmes et des viandes conservées sous vide.

III- Les *Pseudomonadaceae* et les bactéries psychrotrophes

III-1- Introduction

L'intérêt de la réfrigération est de ne pas induire de modifications organoleptiques des produits alimentaires, alors que les autres procédés physiques ne conservent pas toujours aux denrées un aspect de production frais. Les microorganismes psychrotrophes sont définis sur la base de leurs caractéristiques spécifiques en matière de thermosensibilité. Ils se développent à une T° égale ou inférieure à 7°C, indépendamment de leur T° optimale de croissance.

III-2- Principales bactéries psychrotrophes

Il est possible de classer les bactéries psychrotrophes en 2 groupes, en fonction de leurs effets : les agents toxi-infections alimentaires et les agents d'altérations des aliments.

III-2-1- Agents de toxi-infections alimentaires

Sur la base des statistiques disponibles concernant la fréquence de la contamination des produits alimentaires, la place prépondérante revient à *Listeria monocytogenes* en tant que bactérie psychrotrophe pathogène pour l'homme.

Les espèces *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* de type E sont responsables parfois d'accidents d'origine alimentaire.

D'autres bactéries présentent un intérêt pratique mineur, en particulier *Aeromonas hydrophila*. Aussi certaines souches de salmonella et d'*Escherichia coli* sont susceptibles de se développer entre 5 et 7 °C.

III-2-2- Agents d'altérations des aliments

Les bactéries psychrotrophes agents d'altérations des aliments sont beaucoup plus nombreuses et variées, mais la famille des *Pseudomonadaceae* est souvent la plus représentée. Elle regroupe des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, mobiles par ciliature polaire et aérobies stricts. Le genre *Pseudomonas* possède la meilleure capacité de développement au froid et présente une activité significative jusqu'à une température de 2 °C. Les genres *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Alteromonas* et *Flavobacterium* sont aussi fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires.

Les entérobactéries psychrotrophes appartiennent principalement aux genres *Enterobacter*, *Serratia* et *Hafnia*.

Les bactéries lactiques sont largement représentées au sein du groupe des psychrotrophes. Les lactobacilles présentent une activité jusqu'à une température de 2 °C. On rencontre aussi des *Carnobacterium*, *Streptococcus* et *Pediococcus*.

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

III-3- Influences des bactéries psychrotrophes sur la conservation des aliments

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

III-3-1- Protéolyses et lipolyse

La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres puis de produits de leur décarboxylation ou de leur désamination. Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et exceptionnellement d'une toxicité de l'aliment. Ce type de métabolisme est rencontré en particulier chez les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium*, mais aussi chez les *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus* et les entérobactéries.

A l'exception des lactobacilles, ces différentes bactéries se caractérisent aussi par une activité lipolytique importante. La lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres. Elle modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses, avec apparition du goût de rance, et favorise le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés en méthylcétones.

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

III-3-2- Autres types d'altérations

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

- Les modifications de la consistance du produit, notamment par production d'exopolysaccharides à l'origine par exemple d'une consistance filante des laits décrites avec les genres *Micrococcus* et *Alcaligenes*.
- Les phénomènes d'acidification, par fermentation des sucres, activité caractéristique du groupe des bactéries lactiques, soit les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et

Lactococcus. Lors de processus hétérofermentaires, la formation de gaz et de cétones à l'origine de modifications du goût et de l'odeur du produit.

- L'apparition de colorations, d'odeurs et de saveurs anormales comme développement de couleur bleue suite au développement de *Pseudomonas aeruginosa* ou encore d'amertume par *Pseudomonas fluorescens*.

III-4- Techniques d'identification et clef dichotomique

* L'identification du groupe des *Pseudomonadaceae* est basée sur de caractères suivants :

- Mobilité qui sera étudiée à l'état frais et par inoculation sur une gélose mobilité en culot. Les flagelles peuvent aussi être mis en évidence par coloration spécifique.
- Morphologie cellulaire par examen microscopique et coloration de Gram.
- test d'oxydase.
- Type respiratoire étudié par utilisation de gélose profonde.
- Test d'oxydation/fermentation des substrats carbonés réalisé à l'aide de milieux Hugh et Leifson ou Mevag additionné de glucose ou d'autres sucres.
- Température optimale de croissance :
- Aspect des colonies et pigmentation
- Halophilie : réalisée sur gélose additionnée de 10 % de NaCl.

* Clef dichotomique des bactéries à G- :

1- Coccobacilles ou bacilles non incurvés se développant bien sur une gélose nutritive.

1-1-Oxydase-, fermentation-

1-1-1- Pigment jaune : *Xanthomonas*.

1-1-2- Pas de pigment : certains *Achromobacter*.

1-2- Oxydase+

1-2-1- Pigment violet soluble dans l'alcool et pas dans l'eau et le chloroforme *Chromoabacterium*.

1-2-2- Pigment bleu vert ou fluorescent parfois rouge ou jaune solubles dans l'eau (examen des milieux King A et King B est nécessaire) : *Pseudomonas*.

1-2-3- Pigment jaune ou rouge insoluble dans l'eau : *Flavobacterium*.

1-2-4- Pas de pigment

1-2-4-1- Métabolisme oxydatif avec acidification ou pas d'attaque du glucose, aérobie : *Achromobacter*, *Agrobacterium*.

1-2-4-2- Métabolisme oxydatif avec alcalinisation, aérobie : *Alcaligenes*.

1-2-4-3- Métabolisme oxydatif et fermentaire avec gaz, aéroanaérobie : *Aeromonas*.

1-2-4-4- Métabolisme fermentaire, anaérobie : *Zymomonas*.

2- Coccobacillaire ou bacilles non incurvés, halophiles facultatifs ou obligatoires, isolés à partir de produits salés et donnant une meilleure culture sur milieu salé (10 % de NaCl).

2-1- Métabolisme oxydatif : *Halobacterium*.

L'identification peut être poussée plus loin et confirmée par d'autres tests : culture sur milieu Kligler, sur gélose nitraté, recherche de catalase, de l'assimilation de sucres, de la gélatinase, etc.

IV- Les vibrions

Le genre vibron comprend des espèces saprophytes et de espèces pathogènes qui peuvent contaminer les produits marins. Il rassemble des espèces halotolérantes dont la croissance n'est pas inhibée par la présence de sel.

IV-1- Caractères généraux

Les vibrions appartiennent à la famille des *Vibrionaceae* et ce sont des bactéries à Gram-, incurvées en virgule et très mobiles. Ils possèdent une oxydase, une catalase, généralement une nitrate réductase+ et un métabolisme fermentaire sans production de gaz. Sa croissance est aisée dans des milieux nutritifs usuels mais sa croissance à pH alcalin et son halotolérance sont préférées pour les isoler de milieux contaminés. *Vibrio cholerae* possède des facteurs enzymatiques (mucinease en particulier) qui lui permet l'accès aux cellules intestinales malgré la couche de mucus. Il élabore aussi des substances extracellulaires ayant un effet délétère sur les cellules eucaryotes.

Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs. Leurs colonies sont lisses, brillantes ou translucides. Une de leur caractéristique est leur capacité à se multiplier entre pH 7,0 et 9,0.

-IV- 2- Identification et clef dichotomique

Leur identification repose sur les caractères biochimiques et sérologiques :

- Production d'indole, utilisation des sucres, utilisation du citrate sur milieu de Simmons, production d'acétoïne sur milieu Clark et Lubs, culture en eau peptonée additionnée de NaCl, pouvoir protéolytique sur milieu gélatiné, recherche d'enzymes (LDC, ODC).
- Le pouvoir hémolytique est recherché par mise en contact d'hématies de moutons et d'une culture en bouillon nutritif. Après incubation, le pouvoir hémagglutinant est recherché sur lame sur des hématies de poulet. Le typage s'effectue à l'aide d'un sérum polyvalent spécifique des seuls vibrions cholériques.

La clef de détermination des principaux vibrions est la suivante :

1- Utilisation du saccharose et de mannose et non de l'arabinose : vibrions groupe I h'Heiberg.

1-1- LDC+ ODC+ : vibrions cholériques

1-1-1- VP+ (à 22°C) hémolyse de hématies de moutons+, hémagglutination des hématies de poulets+ :

Vibrio cholerae EL Tor

1-1-2- VP- (à 22°C) hémolyse des hématies de moutons, hémagglutination des hématies de poulets- : *Vibrio cholerae cholerae*

1-2- LDC-, ODC- : *Vibrio costicola*

2- utilisation du saccharose, du mannose et de l'arabinose différentes qu'en I : vibrions groupe II à VIII.

2-1- ODC+, citrate+ : *Vibrio parahaemolyticus*.

2-2- ODC-, citrate- : autres vibrions.

Les milieux d'enrichissement les plus fréquemment utilisés sont l'eau peptonée ordinaire ou encore des milieux liquides comme celui de Wilson Blair. Quand à l'isolement, il peut se faire sur milieux solides comme la gélose nutritive ordinaire à pH 8,5 ou 9,0.

V- Les entérobactéries

V-1- Introduction

C'est un groupe important du point de vue sanitaire. Il comprend plusieurs genres importants et de nombreuses espèces qui sont des hôtes normaux de l'homme et des animaux. Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent 10 % de la flore totale (la majorité sont des anaérobies strictes). Chez l'homme *E. coli* prédomine par rapport aux autres genres. Ce sont des contaminants alimentaires très fréquents d'origine fécale. Ces bactéries sont capables de développement abondants dans un produit alimentaire et donc de dégradations importantes. Certaines sont dangereuses (soit qu'elles génèrent par leur multiplication des substances toxiques : intoxication, soit des bactéries commensales pouvant devenir accidentellement infectieuses, soit qu'ils s'agissent déjà de biotypes pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella*, etc.).

V-2- Caractères généraux

Ce sont des bacilles ou coccobacilles, à G-, oxydase-, catalase+, asporulés. Ils sont mobiles par cils péritriches ou immobiles. La capsule est fréquente chez *Klebsiella*. Ils réduisent les nitrates en nitrites (sauf quelques *Erwinia*) et fermentent le glucose. Ils sont anaérobies facultatifs. Les entérobactéries se multiplient facilement sur milieux ordinaires à pH neutre, à une T° de 37°C. Les principales entérobactéries rencontrées dans l'industrie alimentaires appartiennent aux tribus suivantes :

- *Salmonelleae* : *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*.
- *Escherichieae* : *Escherichia*, *Shigella*.
- *Klebsielleae* : *Klebsiella*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*.
- *Proteae* : *Proteus*, *Providencia*.
- *Yersinieae* : *Yersinia* dont l'espèce type est *Yersinia enterocolitica*.

Une autre tribu, les *Erwinieae* est habituellement classée dans les entérobactéries. Les espèces appartenant à ce groupe sont fréquemment phytopathogènes, elles sont également responsables de la dégradation des végétaux (pourriture molle).

Les coliformes sont les entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C. Généralement, ce groupe n'est pas pathogènes sauf s'ils sont en grands nombres, ils provoquent des intoxications alimentaires. Les coliformes sont utilisés comme flore indicatrice de contamination fécale.

Les coliformes fécaux ou thermotolérants : groupe de coliformes qui cultivent à des T° élevées de l'ordre de 41-44°C.

-V-3- Techniques d'identification et clefs dichotomiques

L'identification est basée sur les tests suivants :

- Mobilité : par observation microscopique à l'état frais ou par utilisation d'une gélose mannitol-mobilité.
- Fermentation avec ou sans gaz, utilisation du lactose, du glucose et production d'H₂S. Cette étude peut avoir lieu sur milieu de Kligler.
- Dégradation de l'urée et production d'indole qui peut être étudiée sur milieu de Fergusson.
- Réaction de rouge de méthyle et Voges-Proskauer (RM-VP) étudiée sur milieu de Clark et Lubs.
- Utilisation du citrate : testée sur milieu de citrate de Simmons.

Des études complémentaires comme la recherche de la β -galactosidase, de la lysine décarboxylase (LDC), de la gélatinase et de la dégradation du malonate permettent l'identification.

La clef générale des entérobactéries est la suivante :

1- Lactose+ (en 24h) : coliformes.

Citrate- : *Escherichia coli*.

Citrate+ RM+ VP- *Citrobacter*

Citrate + RM- VP+ Mobile : *Enterobacter*

Citrate + RM- VP+ immobile : *Klebsiella*.

2- Lactose- (en 24h)

Urée+ Glucose fermenté avec gaz et β -galactosidase- : *Proteus*.

Urée + Glucose fermenté sans gaz et β -galactosidase+ : *Yersinia enterocolitica*.

Urée- mobile indole + : *Providencia* (H_2S -) ou *Edwardsiella* (H_2S +).

Urée - Mobile Indole- gélatine - : *Salmonella* sous genre I(RM+VP-) ou *Hafnia alvei* (RM-VP+).

Urée – Mobile Gélatine+, RM+VP- : *Salmonella* sous genre III (β -galactosidase+) ou *Salmonella* sous genre II et IV (β -galactosidase-).

Urée – Mobile Gélatine+, RM-, VP+, pigmenté : *Serratia*.

Urée- Immobile gélatine + RM- VP+ : *Serratia* (LDC-) ou *Salmonella gallinarum* (LDC+).

Une identification plus complète est réalisée en utilisant les caractères suivants : phénylalanine désaminase (APP), tryptophane désaminase (TDA), arginine dihydrolase (ADH), ornithine décarboxylase (ODC), tests de raffinose, glycérol, inositol, sorbitol, etc.

Les clefs de détermination simplifiées des espèces de *Proteus* et *Shigella* sont les suivantes :

Proteus

1- production de H_2S et liquéfaction de la gélatine.

1-1- ODC+ (et généralement indole-) : *Proteus mirabilis*.

1-2- ODC- (et indole-) : *Proteus vulgaris*.

2- Pas de production de H_2S et de liquéfaction de la gélatine.

2-1- ODC+ : *Proteus morganii*

2-2- ODC- : *Proteus rettgeri*

Shigella

1- Mannitol+

1-1- ODC+ : *Shigella sonnei*

1-2- ODC- : sorbitol+ (*Shigella boydii*), sorbitol- (*Shigella flexneri*)

2- Mannitol- : *Shigella dysenteriae*.

-V-3- Techniques d'isolement et de différenciation

Ces techniques permettent l'isolement des entérobactéries d'origine intestinale.

- Entérobactéries totales

Le dénombrement s'effectue sur un milieu gélosé inhibant la croissance des bactéries à G+ et de la plupart des autres à G-. La gélose la plus utilisée est la gélose glucosé biliée au cristal violet et au rouge neutre

(VRBG). Les colonies rouges d'au moins 0,5 mm de diamètre correspondent aux entérobactéries. Il existe aussi d'autres géloses comme la gélose Endo, la gélose EMB, la gélose BCP.

Les entérobactéries lactose+ sont jaunes sur BCP et rose sur Endo et les lactose- sont incolores sur Endo et bleues sur BCP.

- Colimétrie en milieu liquide

Les milieux utilisés sont le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) ou le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (BCP) avec cloche de. Incubation à 37°C pendant 24 à 48h. Le virage d'indicateur coloré et la production de gaz et un test présomptif de la présence de coliforme qui nécessite une confirmation.

- Colimétrie en milieu solide

Les milieux conseillés sont généralement la gélose au désoxycholate (DL). Après 24h à 37°C, les coliformes donnent des colonies rouges. La gélose lactosé bilié au cristal violet et au rouge neutre (VRBL ou VRBA) et la gélose de Mac Conkey peuvent être utilisées.

- Recherche des entérobactéries pathogènes

Les entérobactéries pathogènes font partie du groupe lactose-. Elles peuvent être directement isolées sur des milieux sélectifs en boîtes de Pétri. La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) est fréquemment utilisée dans l'analyse alimentaire. Elles se présentent sous forme de colonies incolores, transparentes avec parfois un centre noir (colonies H₂S+) et les coliformes qui sont rouges. Il existe d'autres milieux tels que le milieu au désoxycholate citrate (DCL), la gélose DCLS, le milieu de Wilson Blair au bismuth-sulfite, etc.

* La recherche peut se faire après enrichissement sur bouillon au sélénite de sodium ou sur milieu de Muller- Kauffmann pour les salmonelles et le bouillon de sélénite de sodium doublement concentré ou le bouillon GN de Hajna double concentration.

Les colonies de type recherché doivent être prélevées et subir des tests d'identification.

1- introduction

Du point de vue microbiologique, il convient de séparer l'aspect sanitaire et l'aspect altération des produits. L'origine et les propriétés des microorganismes pathogènes et d'altérations sont en effet très différentes, trois types de situations peuvent être envisagés :

1- La première est celle des aliments qui contiennent un taux dangereux de bactéries pathogènes ou de toxines capables de déclencher des troubles chez le consommateur et qui, ne présentent pas de signes d'altérations nuisibles à leur qualité marchande.

2- Dans la seconde, les mesures de maîtrise empêchent le développement des germes pathogènes mais non celui des microorganismes d'altérations ; cela est le cas, par exemple avec les viandes, les volailles, les produits lactés pasteurisés conservés par réfrigération.

3- La troisième concerne la situation dans laquelle les mesures sont efficaces pour les germes d'altérations et pathogènes ; c'est la congélation ou la déshydratation. Ces deux processus n'éliminent pas totalement les risques. Certaines bactéries et surtout les virus sont dangereux même quand ils sont en faibles nombres. L'inhibition de la croissance des bactéries ne les élimine pas totalement.

Cependant la multiplication des microorganismes n'entraîne pas obligatoirement un risque pour le consommateur, ni ne détermine obligatoirement une altération. Les aliments fermentés contiennent des milliards de microorganismes viables sans pour cela être dangereux. Cependant, la marge de sécurité entre le taux de la population souhaitable pour la fermentation, et celui qui est responsable d'altération ou d'infection est habituellement très étroite. Il est donc nécessaire de maîtriser leur innocuité comme celle des autres produits alimentaires.

Les agents impliqués dans les risques microbiologiques alimentaires sont nombreux. Ce sont des virus, des bactéries, des champignons, des parasites et leurs produits de métabolisme, éventuellement toxiques.

Certains aliments sont dits à risque, à base de produits crus (lait crus et dérivés et fromages au lait crus) ou consommés crus (fruits de mer, œufs crus, mayonnaise..), ou encore peu cuits (viandes peu cuites). Le risque de maladie est augmenté chez les personnes aux moyens de défenses altérées (personnes âgées, jeunes enfants, immunodéprimés...). Le risque microbiologique alimentaire correspond à la toxi-infection alimentaire.

Pour protéger la santé du consommateur, la législation sur les aliments est habituellement très sévère ; de plus les toxi-infections font peser de graves préjudices sur l'industrie alimentaire. Pour pallier à ces risques des normes ont été établies pour la manufacture du produit. Pour ce qui concerne l'altération des aliments, l'attitude des industriels est souvent moins rigoureuse en dépit des pertes considérables.

2- Notion de toxi-infection

Ce terme englobe :

2-1- Le pouvoir infectieux

C'est la propriété qu'a une bactérie d'envahir l'organisme et de proliférer. C'est également le pouvoir de contamination, de multiplication et de pénétration, utilisation des métabolites, libération de toxines (souvent d'entérotoxine). Lorsque la composante toxique est importante, on parle alors de toxi-infection. La virulence est le degré de pathogénécité d'un germe infectieux.

2-2- Le pouvoir toxique

Il est dû à la production d'une toxine. Cette toxinogénèse peut être liée ou non au pouvoir infectieux.

2-2-1- Intoxications

Elle se fait par des germes non pathogènes qui peuvent s'ils se multiplient abondamment produire des substances toxiques (toxines enzymatiques) ou des catabolites toxiques (comme les amines produites par décarboxylation à partir d'acides aminés) ; ou encore des endotoxines libérées par lyse bactérienne.

2-2-2- Intoxinations

Elles sont provoquées par des microorganismes qui libèrent une ou plusieurs toxines *in vivo* (comme la toxine tétanique) ou dans l'aliment (toxines botuliniques, entérotoxines staphylococciques, mycotoxines) (Tableau 1).

Tableau 1. Exemples de toxi-infections alimentaires.

Types de maladies	Agents responsables	Groupe microbien
Intoxination Entérotoxines <i>Staphylococcus</i> Botulisme Mycotoxines	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium botulinum</i> Ex. <i>Aspergillus flavus</i>	Bactéries à Gram+ Bactéries à Gram+ Moisissures
Infections Salmonelloses <i>Campylobacter enteritis</i> <i>Yersinioses</i> <i>E. coli</i> enterohémorragique Shigelloses Gastroentérites à <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> Brucelloses Listérioses Infections virales	Plus de 2000 <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>E.coli</i> O157 :H7, <i>E.coli</i> O26:H11 4 espèces de <i>Shigella</i> <i>Vib. Parahaemolyticus</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> Virus entériques (ex. virus de l'hépatite)	Bactéries à Gram- Bactéries à Gram- Bactéries à Gram- Bactéries à Gram- Bactéries à Gram- Bactéries à Gram- Bactéries à Gram- Bactéries à Gram+ Virus

Tableau 1. Exemples de toxi-infections alimentaires (suite).

Types de maladies	Agents responsables	Groupe microbien
Toxi-infections		
Gastroentérites à <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Bactéries à Gram+
Gastroentérites à <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéries à Gram+
Cholera	<i>Vibrio cholerea</i>	Bactéries à Gram-
Gastroentérites opportunistes		
Gastroentérites à <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bactéries à Gram-
Gastroentérites à <i>Plesiomonas shigelloide</i>	<i>Plesiomonas shigelloide</i>	Bactéries à Gram-

3- Exemples d'agents pathogènes ou toxines transmises par les aliments (Tableau 1)

3-1- Salmonelloses

3-1-1- Taxinomie :

Salmonella est une entérobactérie, à Gram-. Elle comprend une seule espèce *S. enterica* et plus de 2000 sérovars qui diffèrent par leurs antigènes de paroi (antigènes somatique ou O) et antigènes flagellaire (antigènes H).

3-1-2- Physiopathologie et symptomatologie des salmonelloses

Les salmonelloses peuvent être classées en 2 :

* Les fièvres typhiques et paratyphiques : dues à des sérovars strictement humains comme *Salmonella typhi* et *S. paratyphi* A et B à transmission est strictement humaine.

* Gastro-entérites : par des sérovars présents chez l'homme et les animaux. Il s'agit des sérovars *S. enteridis*, *S. thyphimurium*, *S. dublin*...

3-1-3- Symptômes

Pour la fièvre typhique et paratyphique, l'infection est septicémique. La dose infectante est de l'ordre de 10^5 germes/g après une période d'incubation de 8 à 15j. Elle débute par des fièvres qui s'élèvent progressivement, septicémie lymphatique... La maladie peut durer de 3 à 8 semaines. Dans certains cas, des complications digestives peuvent être observées, hémorragie et perforation intestinale. Le sérovar *S. typhi* produit aussi 2 entérotoxines.

Gastro-entérites : salmonelloses plus bénignes. Les localisations restent généralement localisées au niveau du tube digestif. L'incubation est courte de 12 à 14h. C'est une gastro-entérite avec diarrhées, vomissements, céphalées, fièvres (38 à 39 °C) avec frissons. La dose infectante dépasse 10^6 germes/g.

3-1-4- Réservoir

Salmonella est hébergée par la plupart des mammifères domestiques ou sauvages, reptiles, oiseaux. Certains sont de simples porteurs asymptomatiques comme les volailles alors que d'autres peuvent présenter des entérites comme les bovins.

3-1-5- Contamination

La contamination des aliments se fait soit par contact avec les excréments d'animaux. Elle peut provenir aussi de porteurs sains humains.

Les aliments incriminés sont principalement les œufs et ovoproduits, les viandes, les volailles, le lait, le poisson, les huîtres...

3-2- Bactéries responsable d'une intoxication alimentaire agissant par sécrétion d'une toxine

Les toxines sont produites par l'agent pathogène dans l'aliment. Elles peuvent être thermostables ou thermolabiles. L'intoxication se produit après ingestion de l'aliment contenant la toxine mais non les cellules microbiennes. Les symptômes diffèrent selon le type de toxine.

3-2-1- Entérotoxines de *Staphylococcus aureus*

- Définition de la bactérie

Elle appartient à la famille des *Micrococcaceae*, cocci à Gram+ associés en grappes, catalase +, immobiles, aérobies- anaérobies facultatifs. Elle se développe à pH compris entre 4,8 et 7,6 et supporte aussi des concentrations de sel élevées (10% (p/v) de NaCl) et une A_w de 0.86. *Staphylococcus aureus* est mésophile (intervalle de croissance varie de 7 à 48°C ; optimum à 20-37°C). Les cellules sont détruites à 66°C en 12 minutes ou à 72°C en 15 secondes.

- Les entérotoxines

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* produisent des toxines qui agissent directement sur la muqueuse intestinale en provoquant des perturbations biochimiques ou des lésions cellulaires. Leur action entraîne des pertes d'eau de la muqueuse vers la lumière intestinale.

Il y'a 8 entérotoxines (A, B, C1, C2, C3, D, E, G). Ce sont des protéines monomériques de faible masse moléculaire (26,9 à 29,5 kDa). Le taux de production de la toxine est directement lié au taux de croissance et à la concentration cellulaire.

Les gènes codant ces toxines sont à l'exception de celui codant la toxine D, chromosomique. Ces protéines sont résistantes aux enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, pepsine). La pepsine (enzyme gastrique), dégrade les entérotoxines à pH < 2. Elles sont également thermostables (5 à 30 minutes à 121 °C et plusieurs heures entre 80 et 120 °C). Elles sont très stables à pH neutre.

- Mécanismes d'actions des entérotoxines

Elles stimulent certains récepteurs nerveux au niveau de la muqueuse de l'estomac qui entraîne une activation du centre nerveux de vomissement lors d'une intoxication alimentaire due à

Staphylococcus aureus. Elles sont des super- antigènes, stimulent donc des populations importantes de lymphocytes T.

- Epidémiologie

L'homme et les animaux à sang chaud constituent les deux principaux réservoirs de ce genre. Chez l'homme, les fosses nasales, la gorge et différentes zones cutanées comme la face, le cuir chevelu... Chez les animaux tels que les bovins et les ovins (fosses nasales, peau, les mamelles). Il a été isolé aussi de l'environnement naturel (sol, eaux douces et marines, poussières, air...).

La contamination des aliments d'origine animale (viande, lait) peut être initiale. Le lait provenant d'animaux présentant des mammites. Quand à celle de la viande peut avoir lieu par contamination des carcasses de mammifères et de volailles au cours de l'abattage à partir du plumage, du pelage, de la peau de la mamelle, les narines... Elle résulte d'une contamination humaine au cours de la fabrication de l'aliment ou de sa préparation.

Mais pour qu'un aliment contaminé par *Staphylococcus aureus* provoque une TIA, il faut que la souche soit productrice de toxine et que l'aliment soit maintenu à T° ambiante (3 à 4h) pour permettre la multiplication du germe et la production de toxines.

On considère l'ingestion d'environ 30g (ou ml) d'un aliment ou 100-200ng de toxines produites par 10^6 - 10^7 cellules/gr (ou ml) peut provoquer une intoxication chez un adulte.

La composition chimique de l'aliment peut influencer la croissance de la bactérie et la toxinogénèse. La croissance de la bactérie est inhibée à des Aw comprises entre 0,91 et 0,95. Elle est également inhibée à pH<5 et aux T° de réfrigération et la toxinogénèse à T < 10 °C. Un traitement thermique détruit la bactérie mais non la toxine.

- Aliments incriminés

Les aliments incriminés fréquemment sont : corn bœuf, saumon, salades, sauces, produits contenant de la crème, fromages, etc.

3-2-2- Bactéries responsable d'une intoxication alimentaire agissant par sécrétion d'une toxine neurotrope: cas de *Clostridium botulinum*

C'est une maladie neurologique due au blocage des synapses cholinergiques par une neurotoxine puissante préformée dans un aliment par *Clostridium botulinum*. Ce dernier regroupe 4 groupes (I, II, III, IV) sur la base de leurs caractères biochimiques (protéolytique, lipolytique, glucidolytique), des produits terminaux de leur métabolisme, de leur physiologie, hybridation ADN-ADN...

Clostridium botulinum est un bacille droit ou légèrement incurvé à Gram+, mobile par ciliature péritriche, anaérobies stricte et formant des spores. La T° optimale de croissance est d 34-37 °C et les T° de toxinogénèse sont à peu les mêmes. La croissance de cette espèce ne se produit pas à

pH<4,5 et à une A_w de 0.93. Les spores ne germent pas en présence de nitrite mais sont thermorésistantes (détruites à 115°C). Les cellules végétatives sont plus sensibles à la température.

Les toxines sont stables dans les acides et faiblement acides. Elles sont thermostables et leur synthèse est optimale à 28-30 °C et possible à 5 °C. La toxicité disparaît après 10 minutes à 80 °C.

▪ Habitat

Les spores de *Clostridium botulinum* sont largement distribuées dans le sol, eaux usées, sédiments des lacs, les eaux marines, les plantes et le contenu intestinal des animaux et des poissons.

▪ Toxines et leurs transmissions

Les neurotoxines botuliniques sont des protéines de grandes tailles et de masse moléculaire élevée (150 kDa) produites au cours de la phase de croissance exponentielle et libérées au cours de la phase stationnaire (après lyse cellulaire). Il existe 7 toxinotypes botuliques : A, B ; C1, D, E, F et G. Elles sont associées à des protéines non toxiques dont le rôle n'est pas connu pour former des complexes différents dont la masse pourra atteindre 900 kDa. Ce complexe se dissocie à pH 8. Les neurotoxines sont thermolabiles (détruites à 90°C en 15 minutes ou par ébullition en 5 minutes)

Les gènes codant ces neurotoxines sont chromosomique (A, B, E et F) et plasmidique (G) et portés par le bactériophage (C et D).

La toxine botulique peut pénétrer dans le corps humain par les voies suivantes :

- Botulisme alimentaire : consommation d'aliments insuffisamment cuits ou conservés sous-vide ; absorption d'eau contaminée.
- Botulisme infantile : absorption de spores de l'agent pathogène par l'enfant, dans l'appareil digestif pas encore complètement développé (aliments contaminés).
- Botulisme de plaie : contact avec des matériaux contaminés lors de travaux agricoles et de maçonnerie ou de consommation de drogues par injection (blessures sur la peau).
- Botulisme par inhalation : inhalation de particules infectieuses

▪ Mode d'action des neurotoxines

Après ingestion, la toxine pénètre dans la circulation lymphatique et sanguine qui survient au niveau du duodénum et du jéjunum. Au niveau système nerveux périphérique, la toxine agit en bloquant la libération des neuromédiateurs au niveau des synapses cholinergiques afférentes à la jonction neuromusculaire empêchant ainsi la libération de l'Ach. Le mécanisme neurotoxique comprend 3 étapes :

Au cours de la première étape, la toxine se fixe sur des sites récepteurs spécifiques de la membrane présynaptique. La seconde étape met en jeu la translocation de la toxine à travers la membrane présynaptique. L'étape finale est celle du blocage de la libération des neurotransmetteurs qui stimule le fonctionnement des nerfs qui à leur tour le système sympathique. Ce dernier contrôle le fonctionnement du cœur, des poumons et des vaisseaux sanguins. En absence d'activation de ce système, ces organes cessent de fonctionner.

- Epidémiologie

Dans le botulisme humain, on rencontre les types A, B et E. le dernier type est transmis principalement par le poisson et autres produits de mer. Les spores de cette bactérie sont rencontrées dans le sol et les sédiments marins.

Le botulisme est un empoisonnement résultant de l'ingestion de toxines préformée dans l'aliment. On considère que 0,1 à 1 µg de toxine de type A pourrait tuer un homme.

Cliniquement, on distingue une période d'intoxication qui varie de quelques heures à 5 jours. La période d'invasion est caractérisée essentiellement par des troubles oculaires et troubles sécrétoires. Ces dernières s'accroissent jusqu'à la paralysie de l'accommodation. Des signes plus rares peuvent apparaître tels que paralysie musculaire, tachycardie....

Le seul traitement du botulisme est la sérothérapie spécifique. On utilise les sérums spécifiques de type ou du sérum polyvalent (ABE ou AB), lorsque le type n'est pas connu.

- Aliments incriminés

Ce type d'empoisonnement ne peut avoir lieu qu'après survie des spores dans l'aliment, leur germination, multiplication cellulaire et production de la toxine. Il est souvent associé à la consommation de végétaux (asperges, épinards, haricots verts, maïs, poivre, champignons), de fruits (figues et pêches), viande et poissons.

Les pommes de terre cuites, servies dans une feuille d'aluminium, peuvent constituer un environnement particulier pour des organismes pathogènes. Les pommes de terre, même après lavage, sont couvertes de *Clostridium botulinum*, naturellement présente dans le sol. Si elles ne sont pas bien cuites, ces germes peuvent se multiplier et produire des toxines après le retrait des pommes de terre du four.

3-2-3- *Clostridium perfringens*

- Définition

Elle se présente sous forme de bâtonnets larges (1 à 1,5µm), immobiles, extrémités carrées, sporulés, à Gram positif, et anaérobies strict mais aérotolestants. *C. perfringens* sporule rarement dans les milieux usuels de culture, uniquement dans des milieux spéciaux de sporulation.

Les cultures sont très gazogènes, et les sulfites sont réduits (colonies noires en présence de sulfite de sodium et d'alun de fer). *C. perfringens* est glucidolytique (acidification notamment du glucose, lactose, et maltose) et protéolytique. La croissance est observée entre 10-50°C (optimum 40-45°C).

▪ Toxines et transmission

Clostridium perfringens produit et secrète de nombreuses toxines et enzymes hydrolytiques : toxine α (phospholipase C) principale responsable des lésions de myonécrose, toxine θ (perfringolysine) hémolytique et nécrosante, entérotoxine qui est responsable de l'intoxication alimentaire et n'est synthétisée qu'au cours de la sporulation, toxine β_1 responsable d'entérite nécrosante chez l'homme et l'animal, toxine β_2 responsable d'entérite nécrosante chez l'animal, toxine ϵ responsable des entérotoxémies du bétail, toxine ι responsable d'entérotoxémie chez certains animaux (veaux).

Selon les principales toxines produites, les souches de *C. perfringens* sont classées en 5 toxinotypes, mais le typage génétique montre une plus grande diversité des souches.

Type A: souches produisant toxine α , et parfois entérotoxine et/ou β_2

Type B: souches produisant toxines α , β_1 , ϵ

Type C: souches produisant toxines α , β_1 , et/ou β_2

Type D: souches produisant toxines α , ϵ

Type E: souches produisant toxines α , ι

L'entérotoxine peut être produite par des souches de type A, mais aussi par des souches des autres types. Elle est thermolabile.

▪ Réservoir

C. perfringens est une bactérie très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, eaux d'égout, lisiers, cadavres, poussières, surface des végétaux, etc.)

▪ Epidémiologie

C. perfringens est responsable de nombreuses maladies sévères chez les animaux notamment :

- entérite nécrotique des jeunes porcelets et plus rarement des jeunes des autres espèces
- entérotoxémies des ovins, des bovins, et parfois autres espèces
- dysenterie de l'agneau
- entérite nécrotique des volailles

Il n'y a pas de transmission directe connue entre l'animal malade et l'homme.

Lors d'une intoxication alimentaire, les symptômes apparaissent entre 6 et 24h, généralement 10-12h, après l'ingestion du repas contaminé. Ils se traduisent surtout par de la diarrhée et de

violents maux de ventre, parfois de nausées. Les vomissements et la fièvre ne sont pas habituels. Le plus souvent, cette affection guérit spontanément en 2-3 jours. Toutefois, des mortalités ont été observées chez des personnes âgées et des jeunes enfants.

- entérite nécrotique (Pigbell ou Darmbrand).

Cette affection qui se traduit par de la diarrhée souvent hémorragique et une nécrose de la paroi intestinale, sévit dans des populations habituellement végétariennes qui consomment occasionnellement des préparations de viande, principalement de porc, contaminées par des souches de type C.

C. perfringens est aussi un agent de gangrène sévère chez l'homme. Par ailleurs, l'homme et les animaux sains peuvent être porteurs de *C. perfringens* dans leur tube digestif. Mais, le nombre de *C. perfringens* dans le contenu digestif est faible, 10 à 10^3 /g.

- Mode d'action des toxines

L'intoxication alimentaire à *C. perfringens* survient uniquement après consommation d'aliments lourdement contaminés par une souche entérotoxigène.

L'ingestion d'un grand nombre de *C. perfringens* permet son implantation dans l'intestin grêle. Une partie des bactéries ingérées est tuée au niveau de l'estomac (pH très acide, milieu riche en protéases) et la flore digestive résidente de l'intestin s'oppose à leur développement. Mais, ingéré en surnombre, *C. perfringens* se multiplie dans le contenu de l'intestin grêle (10^8 - 10^9 germes/g), sporule, synthétise l'entérotoxine, qui libérée après lyse de la paroi bactérienne, interagit avec les entérocytes provoquant une fuite d'eau et d'électrolytes.

De ce fait, *C. perfringens* est retrouvé en nombre élevé (supérieur à 10^6 /g) dans les selles des malades. L'entérotoxine est également présente dans les selles au cours de la phase symptomatique de la maladie.

- Population exposée

L'intoxication alimentaire à *C. perfringens* atteint essentiellement les personnes prenant leur repas dans des restaurants collectifs, cantines scolaires, restaurants d'entreprise, etc.

- Population à risque

Les personnes âgées prenant leurs repas à partir de cuisine collective (maisons de retraite, hôpitaux, service à domicile à partir d'une cuisine centrale) sont particulièrement à risque, car elles développent une forme généralement plus sévère de la maladie. De même, les jeunes enfants sont particulièrement à risque et développent des formes plus sévères.

- Relations dose-effet et dose réponse

Les aliments ou préparations culinaires responsables d'intoxication alimentaire contiennent au minimum 10^5 formes végétatives vivantes de *C. perfringens* entérotoxigènes par gramme,

concentration à partir de laquelle il y a possibilité de multiplication dans l'intestin grêle de l'hôte, sporulation et production d'entérotoxine. L'expression du gène de l'entérotoxine est coréglée avec celle des gènes de la sporulation. Les aliments contaminés ne contiennent pas d'entérotoxine préformée, car *C. perfringens* ne sporule habituellement pas dans les préparations culinaires.

▪ Diagnostic

Le diagnostic biologique de l'intoxication alimentaire à *C. perfringens* est basé sur la recherche de *C. perfringens* entérotoxino-gène et/ou d'entérotoxine dans les selles des malades, ainsi que sur l'analyse des aliments en cause. Le dénombrement et l'identification des *C. perfringens* à partir des selles sont réalisées sur gélose au sang de mouton ou contenant alun de fer et sulfite de sodium. La D-cycloserine (400 mg/ml) peut être utilisée comme agent sélectif. Des milieux sélectifs tels que tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) sont disponibles dans le commerce. L'identification des colonies repose sur la morphologie des bactéries, leur immobilité, la fermentation du lactose, la production de lécithinase et de gélatinase. Pour mettre en évidence la production d'entérotoxine, il faut au préalable obtenir une culture sporulée.

L'entérotoxine peut être détectée par son effet cytopathique sur culture cellulaire, ou par test immunologique. La présence du gène de l'entérotoxine est aisément détectable par PCR. L'entérotoxine de *C. perfringens* est présente dans les selles des malades dans des concentrations de 1 à 100 mg/ml, alors qu'elle n'est pas détectable chez les individus non symptomatiques. Des tests rapides d'identification de l'entérotoxine (ELISA, hémagglutination, agglutination de particules de latex) sont disponibles. Les dénombrements sur milieu TSC sont généralement pratiqués. Une quantification et identification rapide peut être faite par PCR.

▪ Traitement et prévention médicale

Le traitement est le plus souvent symptomatique. La réhydratation est préconisée dans les formes sévères de déshydratation.

L'antibiothérapie n'est pas recommandée, excepté dans les formes sévères. *C. perfringens* est sensible à la plupart des antibiotiques, notamment β -lactamines, mais pas aux aminosides.

▪ Aliments incriminés

Ce sont les préparations à base de viande qui sont les plus fréquemment à l'origine d'intoxication alimentaire. Le plus souvent, il s'agit de préparations culinaires réalisées à l'avance et en grande quantité. L'aliment le plus typique consiste en des viandes en sauce, cuisinées en grand volume et à l'avance, qui n'ont pas été refroidies suffisamment vite entre le moment de leur préparation et celui où elles atteignent la température ambiante. Les préparations à forte teneur en amidon, comme haricots, notamment haricots en sauce, sont également à risque.

La cuisson détruit la plupart des formes végétatives, mais pas ou peu les spores. L'ébullition a aussi comme effet de permettre un dégazage de la préparation culinaire, donc de favoriser des conditions d'anaérobiose suffisante pour la croissance de *C. perfringens*. Les préparations en grand volume sont particulièrement propices à cet effet, car la ré-oxygénation au contact de l'air ambiant est plus lente que dans les petits volumes.

Etant donné que *C. perfringens* se multiplie rapidement dans un milieu à base de viande ou d'amidon dans un intervalle de température entre 50 et 30°C, un maintien des préparations culinaires pendant plusieurs heures dans cette gamme de température rend possible une prolifération de cette bactérie au-delà du seuil critique.

3-2-4- Mycotoxines

De nombreuses souches de moisissures sont productrices de métabolites secondaires toxiques pour l'homme, les animaux et les oiseaux ; ce sont les mycotoxines. Ce sont des empoisonnements provoqués par l'ingestion d'aliments contaminés par des toxines produites par des moisissures. Chez l'homme, les manifestations aiguës sont rarement observées mais exposés plus fréquemment aux effets chroniques des mycotoxines. Sur le tableau 2 figure quelques exemples de mycotoxines connues avec l'indication de la moisissure productrice et des effets pathogènes.

Les espèces productrices de ces toxines appartiennent sont principalement *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (produisent aflatoxine) *Penicillium patulum* (patuline), *Penicillium roqueforti* (roquefortine), *Fusarium verticillioides* (fumonisine). Les souches toxigènes ne peuvent être différenciées de celles qui ne le sont pas sur la base des caractères morphologique. Une recherche des mycotoxines doit se faire après croissance des souches.

Les spores des moisissures sont présentes dans le sol, la poussière et dans l'environnement. Et de nombreux aliments peuvent abriter des spores et des mycéliums, spécialement avant le traitement thermique.

Différents types de mycotoxines sont produits par de nombreuses souches de moisissures et l'aflatoxine B1 est considérée comme la plus puissante.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires et leur production est liée au taux de croissance de la souche. La production de l'aflatoxine est optimale à 33°C, pH 5.0 et une a_w de 0.99. Les mycotoxines sont des molécules de petites tailles non immunogènes et généralement thermorésistantes

La présence de mycotoxines a été détectée dans de nombreux aliments. Ils incluent le maïs, seigle, orge, blé, haricots, épices, pommes de terre, les pommes, etc.

L'aflatoxine a fait l'objet de nombreuses études. Elle est produite par *Aspergillus flavus* et de nombreuses espèces voisines. Il existe 4 types d'aflatoxines naturelles : B1, B2, G1 et G2, trouvées dans les végétaux moisiss (graines sèches, tourteaux d'arachides...). Lors de l'ingestion par un animal, la toxine est modifiée en M1 et M2 (encore plus toxique) et peut se retrouver dans le lait.

L'ingestion d'un aliment contenant des mycotoxines peut être la cause de graves maladies de foie, des reins, de l'appareil circulatoire et des organes hématopoïétiques, carcinomes hépatiques dans les populations qui sont alimentées par des aliments pauvres en protéines.

La présence également de ces moisissures sur les produits alimentaires diminue aussi la qualité des produits, perte des matières sèches dans les cas des céréales, modifie la qualité nutritionnelle d'où une perte économique.

Pour toutes ces raisons il est nécessaire de mettre en œuvre des mesures de prévention pour empêcher ou limiter le développement des moisissures dans les produits sensibles (céréales, farines, pain, des fruits, des jus de fruits, etc.). Des mesures semblables doivent être prises avec les matières premières destinées à la fabrication des aliments animaux, afin d'éviter l'apparition de mycotoxicoses chez les animaux et d'empêcher la présence de résidus de mycotoxines dans le lait, la viande et les oeufs.

Tableau 2. Mycotoxines, moisissures responsables et effets pathologiques

Mycotoxines	Origine	Effets indésirables
Aflatoxine	<i>Aspergillus flavus</i>	Carcinogénèse, généralement hépatique
Crisofanol	<i>Penicillium islandicum</i>	Mutagenèse
Citrinine	<i>Penicillium</i> sp.	Néphrotoxicité
Fumagilline	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cytotoxicité
Fusaricine C	<i>Fusarium moniliforme</i>	Mutagenèse
Acide kojique	<i>Penicillium</i> sp. et <i>Aspergillus</i> sp.	Convulsions

3-2-4- Viroses

▪ Généralités

Les virus, à la différence des microorganismes ne peuvent pas se multiplier dans les aliments. Le nombre de particules infectantes, initialement présentes dans un produit donné, aura tendance à diminuer par inactivation spontanée. Cependant, la dose infectieuse nécessaire pour initier l'infection est très faible.

▪ Hépatite de type A

Le virus le plus important est le virus de l'hépatite A. Il est d'origine fécale et pénètre dans l'organisme par voie digestive, avec l'eau ou certains aliments.

Le délai d'incubation de la maladie varie de 2 à 4 semaines et les denrées incriminées sont les produits de mer provenant d'eaux contaminées, eaux de boisson polluées, fruits et légumes souillés par l'eau, etc.

Les mesures de prévention de l'hépatite A consiste à éviter les contaminations d'origine fécale de l'eau et des aliments et à suivre les règles rigoureuses d'hygiène individuelle. Le virus peut résister à la pasteurisation.

3-2-5- Intoxications par les amines vasoactives

Les aliments qui contiennent des quantités élevées d'amines comme l'histamine, tyramine, tryptamines, etc. appelées aussi amines vasoactives, peuvent déterminer chez le consommateur une intoxication parfois aigue. Ces amines sont produites par de nombreuses espèces bactériennes dans les aliments riches en peptides et en acides aminés. Elles sont très thermorésistantes, ce qui explique leur présence dans des conserves de poisson.

Ces intoxications sont caractérisées par une rougeur du visage et quelquefois des troubles respiratoires et circulatoires. La sensibilité diffère d'un individu à l'autre, ou, pour un même individu, selon les circonstances ; elle est due à la variation des enzymes d'inactivation, les monoaminoxydases.

La prévention des troubles vasoactifs consiste à inhiber la croissance et le métabolisme des germes en cause par réfrigération des matières premières ou par addition de sel ou par une combinaison des deux.

3-2-6- Autres microorganismes eucaryotes

Les microorganismes eucaryotes peuvent synthétiser des toxines puissantes, ce sont les phycotoxines (provenant d'algues) contaminant les poissons. Elles peuvent également contaminer les coquillages qui sont ensuite consommé par l'homme. La plupart des toxines sont produites par des dinoflagellés et des diatomées et la plupart sont thermostables. Parmi les principales maladies humaines, on a des empoisonnements amnésogènes, diarrhéiques et neurotoxiques dues aux coquillages.