

2019/2020

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE ET MECANISMES DE LA PATHOGENIE CHEZ LES BACTERIES

Master science des aliments et bioproduits

Faouzia Benhallam

1-Introduction :

La microbiologie alimentaire est la science qui étudie les microorganismes (bactéries, virus, champignons, protozoaires) qui ont un effet bénéfique ou néfaste sur la qualité et la salubrité des aliments et/ ou qui sont associés aux intoxications alimentaires.

Elle s'intéresse à leur croissance, leur identification et leur pathogénèse.

C'est une science qui peut inclure aussi bien la microbiologie que l'épidémiologie, l'hygiène, la biochimie, les statistiques et les modèles mathématiques.

Les aliments sont pour la plupart non stériles et constituent de bons milieux pour le développement des microorganismes.

Ainsi la qualité microbiologique des aliments peut être rapidement altérée si la croissance des microorganismes n'est pas parfaitement inhibée.

Si le taux de microorganismes non pathogène est supérieur à 10^6 bactéries par gramme la qualité organoleptique et nutritionnelle de l'aliment se dégrade. L'aspect de l'aliment peut aussi être modifié. Ceci implique de grosses pertes économiques mais pas de conséquences sur la santé.

En revanche si les germes sont pathogènes ils vont provoquer des maladies chez le consommateur :

- Une maladie infectieuse : provoquée par l'ingestion de germes pathogènes vivants.
- Une intoxication : déclenchée par l'ingestion d'une toxine exogène produite par un germe préalablement développé dans l'aliment.

2-Nature des microorganismes prédominant dans les aliments :

Selon leur structure cellulaire les microorganismes sont soit des microorganismes procaryotes soit des microorganismes eucaryotes.

- **Les microorganismes procaryotes** regroupent les bacteria (bactéries) et les archaea (archéobactéries). Ces derniers ressemblent aux bactéries par leur structure de cellule procaryote mais en diffèrent au niveau moléculaire. Les archéobactéries sont les bactéries de l'extrême et elles ne présentent pas d'intérêt en microbiologie alimentaire.

- **Les microorganismes eucaryotes** regroupent les algues, les protozoaires et les champignons.

•Les bactéries :

La cellule bactérienne a une taille comprise entre 0,1 et 10µm. Elles ont une forme sphérique(cocci) ou en bâtonnet(bacilles). Les cellules peuvent être isolées ou associées (en deux, en chaîne, tétrades, grappes ...).

Les bactéries possèdent une paroi rigide (à l'exception des mycobactéries), une membrane cytoplasmique qui forme des replis (le mésosome). Le cytoplasme est immobile et ne contient pas d'organites entourés par une membrane. Leur matériel génétique est formé par une molécule d'ADN circulaire, sans histones, et parfois des plasmides. La multiplication bactérienne se fait par fission binaire. Leurs ribosomes sont de type 70 S.

Certaines bactéries sont mobiles par des cils ou des flagelles, d'autres possèdent une capsule ou peuvent former des spores.

Selon leur type de paroi les bactéries sont classées en Gram positif et en Gram négatif.

Les principaux genres bactériens qu'on trouve en microbiologie alimentaire :

Acinetobacter	Erwinia	Proteus
Aeromonas	Escherichia	Pseudomonas
Alcaligenes	Flavobacterium	Psychrobacter
Arcobacter	Hafnia	Salmonella
Bacillus	Kocuria	Serratia

Brevibacillus	Lactococcus	Shewanella
Brochothrix	Lactobacillus	Shigella
Burkholderia	Leuconostoc	Sphingomonas
Campylobacter	Listera	Stenotrophomonas
Carnobacterium	Micrococcus	Stephylococcus
Citrobacter	Moraxella	Vagococcus
Clostridium	Paenibacillus	Vibrio
Corynebacterium	Pandorrea	Weissella
Enterobacter	Pantoea	Yersinia
Enterococcus	Pediococcus	

• Les mycètes ou champignons

Les champignons microscopiques peuvent être unicellulaires (Levures) ou filamenteux. Ils sont saprophytes et hétérotrophes

On distingue 4 classes de mycètes selon la morphologie des hyphes : les ascomycètes, les basidiomycètes, les phycomycètes et les Deutéromycètes.

Les mycètes présentant un intérêt en microbiologie alimentaire sont les moisissures et les levures.

➤ Moisissures

Elles sont pluricellulaires et constituées de filaments longs, fins et ramifiés, que l'on nomme hyphes. Ces hyphes peuvent être cloisonnés ou non cloisonnés et forment un mycélium. Les hyphes peuvent se multiplier d'une façon asexuée, ou d'une façon sexuée. Ils sont autotrophes et saprophytes.

Les cellules possèdent une paroi constituée de carbohydrates (mannanes, chitine, glucane et callose) leur membrane plasmique contient des stérols. Leur cytoplasme est mobile et contient des organites (mitochondries, vacuoles...) leurs ribosomes sont de type 80 S. Leur ADN est linéaire, contient des histones et entouré par une enveloppe. Les *moisissures rencontrées en microbiologie alimentaire* :

Alternaria
Aspergillus
Aureobasidium
Botrytis
Byssochlamys
Cladosporium

Colletotrichum
Fusarium
Geotrichum
Monilia
Mucor

Penicillium
Rhizopus
Trichothecium
Wallemia
Xeromyces

Principaux genres de champignons d'intérêt alimentaire

Les Mucorales

- Genre *Mucor* (accident de fabrication des fromages, se développe sur les surfaces humides, sur le riz, le maïs, le blé et le seigle, flore de surface de certains fromages).
- Genre *Rhizopus* (altération de fruits, de légumes et de céréales).

Les deutéromycètes

- Genre *penicillium* (*P. roquefortii*, *P. camembertii*, *P. album*).
- Genre *aspergillus* (contamination de céréales production d'aflatoxines).
- Genre *Fusarium* (altération de fruits + fusaritoxicose, plusieurs toxines).
- Genre *Alternaria* (Altération d'aliments végétaux).
- Genre *Neurospora* (pourriture de fruits).

Conditions de développement des moisissures

Ce sont des organismes hétérotrophes donc se développent sur un substrat organique (produits alimentaires, bois humide papier, cuir).

Dans un premier temps il y a utilisation d'oses (glucose, xylose) ou diosides (Maltose, saccharose), ultérieurement des polyosides (amidon cellulose chitine lignine) sont dégradés par des enzymes glucido-lytiques extracellulaires.

Leurs capacités protéolytiques sont limitées. Ils sont selon les espèces soit autotrophes ou hétérotrophes pour l'azote. Ils utilisent les nitrites ou les sels ammoniacaux comme sources d'azote mais aussi les acides aminés libres dans certains aliments.

Leur activité d'eau A_w est variable selon les espèces mais les spores ne germent pas si $A_w < 13\%$.

Leur température de végétation maximale entre 20 et 30°C mais tolèrent de +3° à 40°C.

Exception : *Neurospora Sitophila* non détruite par la cuisson

Fusarium tricinetum se développe à -10°C

Les spores sont détruites à 120°C pendant 20 à min en chaleur humide et 3h à 160°C en chaleur sèche.

Ils se développent en milieu légèrement acide.

➤ Les levures

Les levures font aussi partie des mycètes et de l'embranchement des ascomycètes. Cependant, une levure est unicellulaire, de très petite taille (6 à 10µm), possède un seul noyau. Elle dispose de deux moyens de reproduction : de façon asexuée par **bourgeonnement** et de façon sexuée par formation de **spores**. Chaque bourgeon qui se sépare forme une nouvelle levure identique à la levure initiale. Les levures peuvent également rester accolées pour donner des pseudo mycéliums (candida)

. Les genres les plus répandue en microbiologie alimentaire sont :

Brettanomyces/Dekkera

Candida

Cryptococcus

Debaryomyces

Hanseniaspora

Issatchenkia

Kluyveromyces

Pichia

Rhodotorula

Saccharomyces

Schizosaccharomyces

Torulaspota

Trichosporon

Yarrowia

Zygosaccharomyces

Conditions de développement des levures :

Elles fermentent les glucides, certains peuvent oxyder les alcools ou les acides organiques. Elles sont osmophyles.

La température optimale de croissance est entre 25 et 30°C et les températures tolérées sont entre 35 à 47°C,

Elles s'adaptent à tous les pH mais préfèrent le pH acide.

Intérêt économique :

-Production d'aliments : vinification, brasserie, cidrerie, distillerie, panification

-Culture en masse : production de protéines.

- Altération des aliments.

➤ Les protozoaires :

Les protozoaires sont des êtres uni cellulaires dépourvus de paroi, certains vivant en colonies. Ils ont un habitat aquatique. La tailles des protozoaires varie de 2 à 70µm. Ils peuvent se multiplier par voie asexuée (fission binaire ou multiple, bourgeonnement) ou par voie sexuée (formation de gamètes ou par conjugaison). Les genres les plus importants en microbiologie alimentaires sont :

- *Cryptosporidium parvum*
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Entamoebia histolytica*
- *Giardia lamblia*
- *Toxoplasma gondii*

➤ **Virus :**

Ce sont des particules acellulaires. Ils ont un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et quelques protéines qui forment la capsid. Le virus se reproduit par réplication de son matériel génétique à l'intérieur des cellules hôtes. Ce sont des parasites intra cellulaires obligatoires.

Les virus ne peuvent pas se développer dans les aliments mais ils peuvent causer des maladies lors de l'ingestion d'aliments contaminés.

Les bactériophages sont importants en microbiologie alimentaire car ils peuvent nuire au processus de la fermentation. Les virus peuvent causer des infections alimentaires.

3-Source des microorganismes dans les aliments :

3-1 Origine

Les microorganismes se trouvent dans tous les écosystèmes naturels comme le sol l'air, l'eau et aussi sur les végétaux, les animaux et les humains.

Les aliments proviennent soit d'animaux ou de végétaux et par conséquent la flore normale qui leur est associée peut se retrouver dans notre nourriture (contamination primaire), en plus de contamination par les microorganismes de l'environnement extérieur (contamination secondaire). Cette contamination peut affecter la qualité organoleptique ou commerciale de l'aliment, comme elle peut provoquer des intoxications alimentaires du consommateur.

Les principaux germes contaminants sont :

➤ **Les germes Hydriques :**

Ce sont surtout des bactéries provenant du sol (Micrococcus, Pseudomonas...) ou des matières fécales humaines ou animales (Entérobactéries, Entérocoques). Ce sont des germes d'altération et parfois peuvent causer des intoxications.

Les moisissures comme Aspergillus, Penicillium, Fusarium sont également présent dans l'eau et sont source de contamination.

Les levures sont peu présentes dans l'eau et on les rencontre rarement dans la contamination par les germes de l'eau.

Les produits maritimes peuvent être contaminés par les germes de l'eau de mer (Bacillus, Aeromonas et Pseudomonas). Ce sont des germes non pathogènes mais peuvent altérer le poisson.

➤ **Les germes telluriques :**

Parmi ces germes on trouve ceux qui sont dans l'eau. Notons cependant l'importance de Clostridium dans la flore du sol.

➤ **Germes contenus dans l'air :**

L'air contient un grand nombre de cellules bactériennes (Micrococcus et bactéries sporulantes) et aussi des champignons (Aspergillus, Alternaria ; Penicillium)

➤ **Germes présents sur les produits eux même :**

Les aliments peuvent être contaminés par les microorganismes qui se trouvent à leur surface (Peau des animaux, enveloppes des végétaux ; coquilles d'œufs ...). Ce sont soit des bactéries des champignons ou des levures (Saccharomyces).

Les viscères sont la cause principale de la contamination des viandes et du poisson). Le tractus intestinal de l'homme ou des animaux contient jusqu'à 10^{11} germes par gramme (gros intestin) : parmi les bactéries les plus fréquentes : Bifidobacterium (Lactobacillus bifidus), Bacteroides, Escherichia, Proteus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium, Paracolobactrum, Pseudomonas. Parmi les levures Candida, etc...

➤ **Ustensiles de cuisines et personnel :**

Lors de leur transformation les aliments peuvent être contaminés par les germes provenant des machines (mixeurs, broyeurs ...) et des ustensiles (couteaux, planches à découper...)

Le personnel constitue également une source importante de germes dont les entérobactéries (Escherichia, Salmonella...) Les personnes qui n'observent pas un niveau suffisant de propreté personnelle, qui souffrent de certaines maladies ou affections, ou se comportent de manière inappropriée, peuvent contaminer les aliments et transmettre des maladies aux consommateurs.

3-2 Conséquences

La présence de micro-organismes dans les aliments peut aboutir à leur altération, à leur amélioration ou peut être à l'origine de toxi-infections alimentaire.

- **Dégradation de l'aliment :** détérioration des qualités diététiques et organoleptiques, à cause de la flore banale de contamination.
- **Amélioration de l'aliment :** meilleure conservation et qualités organoleptiques, grâce à une flore utile, auxiliaire de fabrication (yaourt, choucroute, fromage, vin...)
- **Toxi-infections alimentaires :**
 - Accumulation de bactéries pathogènes et leurs toxines (ex. Salmonella)
 - Accumulation de métabolites toxiques (mycotoxines, catabolites toxiques comme l'histamine) .

4-Croissance des microorganismes dans les aliments :

Les microorganismes utilisent les substances nutritives qui se trouvent dans les aliments pour se multiplier, leur croissance est contrôlée par des facteurs liés à l'aliment lui-même, ou facteurs intrinsèques, et aussi par d'autres liés à l'environnement où l'aliment est conservé, ce sont les facteurs extrinsèques :

4-1 Les facteurs intrinsèques :

➤ La composition de l'aliment :

Pour se multiplier chaque microorganisme a besoin de substances nutritives spécifiques, de sels minéraux, de glucides, d'acides aminés, d'acides organiques, d'eau, de facteurs de croissance et de vitamines, donc plus un aliment est riche plus il est favorable à la prolifération microbienne.

➤ Le pH :

Chaque microorganisme à un pH optimum de croissance. Ceci est en relation avec l'activité de ses enzymes, elle-même liée à leur conformation qui varie en fonction de l'acidité du milieu.

Les microorganismes acidophiles ont un optimum de croissance compris entre 0 et 5,5.

Les neutrophiles ont un optimum de croissance compris entre 5,5 et 8.

Les alcalophiles ont un optimum de croissance compris entre 8 et 11.

Un pH acide, inférieur à 4.5, favorise la prolifération des levures, des champignons et de certaines bactéries (bactéries acétiques, propioniques, lactiques...etc.)

Un pH compris entre 4.5 et 9 permet la croissance de nombreuses espèces bactériennes dont les bactéries pathogènes (tableau I).

Tableau I : limite de la croissance des microorganismes en fonction du pH

Micro-organismes	pH min	pH optimum	pH max
Bactéries	4,5	6,5 à 7,5	9
Bactéries acétiques	4	5,4 à 6,3	9,2
<i>Bactéries lactiques</i>	3,2	5,5 à 6,5	10,5
<i>Pseudomonas</i>	5,6	6,6 à 7	8
<i>Entérobactéries</i>	5,6	6,5 à 7,5	9
<i>S. typhi</i>	4 – 4,5	6,5 à 7,2	8 – 9,6
<i>E. coli</i>	4,3	6 à 8	9
<i>Staphylococcus</i>	4,2	6,8 à 7,5	9,3
<i>Clostridium</i>	4,6 – 5		9
<i>C. botulinum</i>	4,8		8,2
<i>C. perfringens</i>	5,5	6 à 7,6	9,4 – 10
<i>Bacillus</i>	5 – 6	6,8 à 7,5	9,4 – 10
Levures	1,5 – 3,5	4 à 6,5	8 – 8,5
Moisissures	1,5 – 3,5	4,5 à 6,8	8 – 11

La prolifération d'un microorganisme dans un aliment est plus importante lorsque le pH de l'aliment est proche de son optimum de croissance.

Le pH extérieur influence le pH intérieur du microorganisme ce qui cause :

- Une perturbation de la perméabilité et des échanges
- Ralentissement des enzymes glycolytiques et en conséquence la production d'ATP
- Dénaturation de l'ADN et des protéines lorsque le pH est faible.
- Indisponibilité des ions métalliques suite à leur complexation aux pH acides ou basiques ce qui les rend insolubles.

➤ **La disponibilité de l'eau :**

Dans les cellules microbiennes, l'eau joue le rôle de solvant des substances nécessaires à la vie cellulaire, elle permet l'ionisation des substances dissoutes, elle sert de transporteur de substances chimiques, participe à la polarisation des membranes et maintien la turgescence cellulaire, elle participe à de nombreuses réactions enzymatiques.

L'eau et sa disponibilité affectent la capacité qu'ont les microorganismes à coloniser les aliments. On peut éviter ou diminuer la détérioration des aliments en les séchant.

Par fois même si l'eau est présente on peut réduire sa disponibilité par ajout de solutés comme le sucre et le sel.

L'activité de l'eau dépend de sa disponibilité. Par définition, l'activité de l'eau A_w d'un corps est le rapport entre la pression de vapeur d'eau(p) au-dessus de la surface de celui-ci et la pression de vapeur(p_0) de l'eau pure :

$$A_w = P / P_0$$

Rappelons que la pression de vapeur est la pression sous laquelle le corps, placé seul à une température constante, est en équilibre avec sa vapeur. Autrement dit, c'est la pression sous laquelle le liquide bout (ou encore le solide se sublime), à la température considérée. La pression de vapeur dépend de la température. L'activité de l'eau A_w et l'humidité relative d'équilibre ERH sont liés par la relation :ERH = 100. A_w

Les microorganismes xérophiles peuvent se développer dans les aliments à faible A_w . Les osmophyles et les halophiles se développent respectivement dans les aliments à forte teneur en sucre et en sel. Aucun microorganisme ne peut se développer sur un aliment à A_w inférieure à 0,65 et aucun pathogène ne peut se multiplier dans des aliments où l' A_w est inférieure à 0,85 exception faite de champignons excréteurs de mycotoxines (tableau II).

Tableau II : Incidence d' A_w sur les microorganismes

Activité de l'eau	Microorganismes
0.7 à 0.9	Bactéries
0.66 à 0.8	Levures
0.7 à 0.8	Moisissures
0.8	Toxines
0.75	Bactéries halophiles
0.7	Levures osmiophiles
0.65	Moisissures xérophiles

➤ **Potentiel d'oxydo-réduction :**

Le potentiel d'oxydo- réduction mesure la capacité d'un milieu à perdre ou à gagner des électrons. Un milieu est dit oxydant lorsqu'il capte des électrons et il est réducteur s'il perd des électrons.

Le potentiel d'oxydoréduction influence la détérioration des aliments par les microorganismes qu'on peut classer en fonction de leurs exigences en oxygène en quatre groupes :

- Les aérobies stricts, ne se développent qu'on présence d'oxygène : Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus
- Les aérobies facultatifs, se développent en présence et en absence d'oxygène : Entérobactéries, Staphylococcus
- Les micros aérophiles ne se développent qu'en présence d'une faible quantité d'oxygène : Lactobacillus, Streptococcus.
- Les anaérobies stricts :ne se développent qu'on absence d'oxygène : Clostridium, Bacteroides.

Le potentiel d'oxydo-réduction d'un aliment dépend de ses caractéristiques physico chimiques, de la présence ou non d'un emballage ; de la pression partielle d'oxygène et de l'ambiance de stockage.

➤ **La structure physique :**

La structure physique d'un aliment affecte également le déroulement et l'étendue de la décomposition. Le broyage des aliments (saucisse, steak haché) augmente la surface de la nourriture, altère la structure cellulaire et permet la dispersion des germes contaminants par tout dans la nourriture.

➤ **La structure biologique :**

La présence d'enveloppes (pelures des fruits), coque (noix, œufs), peau(animaux) confère à certain aliment une résistance à l'altération. Les microorganismes du pourrissement ont souvent des enzymes spécialisées qui leur permettent d'affaiblir et de pénétrer les enveloppes protectrices en particulier lorsque celles-ci sont blessées

➤ **Présences de substances antimicrobiennes naturelles :**

De nombreux aliments contiennent des substances antimicrobiennes naturelles, parmi lesquelles des inhibiteurs chimiques complexes et des enzymes. Les coumarines présentes dans les fruits et les légumes montrent une activité antimicrobienne. Le lait frais contient des lacténines et des enzymes anti-coliformes à activité limitée dans le temps. Les œufs sont riches en lysozyme (enzyme lytique pour la paroi des bactéries GRAM+ contaminants).

Les herbes et les épices contiennent souvent des substances antimicrobiennes importantes : le thymol dans le thym, L'eugénol dans le clou de girofle, l'aldéhyde cinnamique dans la cannelle. L'ail contient l'allicine.

4-2 Les facteurs extrinsèques :

4-2-1-Température :

Les hautes températures agissent en inhibant l'activité des enzymes ,en modifiant les structures secondaires et tertiaires des sous unités ribosomales ,en dénaturant les protéines et en altérant la membrane cytoplasmique ce qui arrête tout métabolisme et aussi la réplication de l'ADN , entraînant ainsi la mort microbienne.

Le froid arrête la croissance microbienne par immobilisation enzymatique, mais ne dénature pas les enzymes, ce qui permet une reprise de la multiplication dès que la température atteint des valeurs proches de l'optimum de croissance.

Plusieurs catégories de microorganismes sont différenciées en fonction de leur capacité à se développer préférentiellement ou exclusivement à telle ou telle gamme de température(figure1)

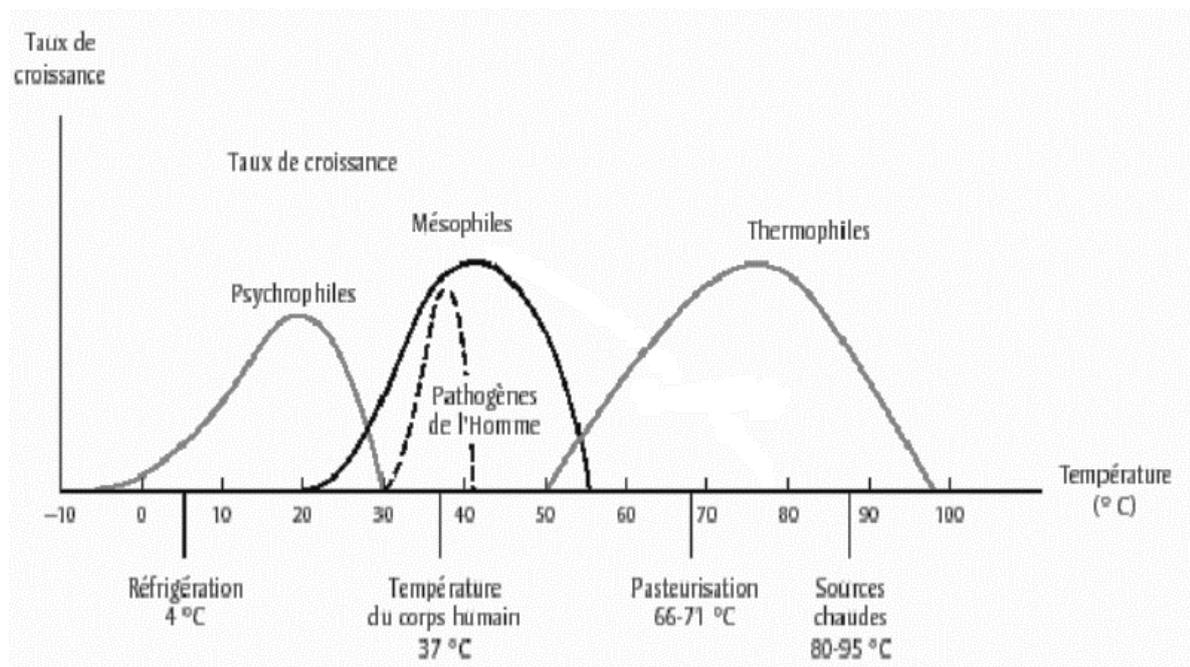


Figure1 : Classification des microorganismes en fonction de leur température de croissance

Pour chaque microorganisme il existe une température minimale, une température optimale et une température maximale de croissance. Ces trois s valeurs sont appelées températures cardinales.

Mésophiles :

Se développent entre 15 et 45°C avec un optimum de 37°C. Leur taux de croissance est élevé

Et leur temps de génération varie de 20 à 30 minutes vers 40° C à quelques heures à 20°C.

Ce groupe comprend les principaux genres de bactéries mais aussi quelques genres de moisissures et de levures. La plupart des germes pathogènes et d'altération sont des mésophiles (Entérobactéries, Clostridium, Bacillus, coques GRAM+...).

Psychrophile et psychrotrophes :

Les psychrophiles (*Bacillus psychrophilus*, *Chlamydomonas nivalis*, *Micrococcus cryophilus*, *Vibrio psychroerythreus*...) sont des micro-organismes qui se développent à des températures allant de 0 à 20°C avec un optimum à 15°C. Ils sont vraiment adaptés au froid et on les rencontre peu en microbiologie alimentaire.

Le groupe des psychrotrophes est représenté par des nombreuses bactéries dont les principaux genres sont *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptomyces*. Notons aussi que les levures et moisissures sont pour la plupart psychrotrophes. Les micro-organismes appartenant au groupe des psychrotrophes sont capables de se développer dans des intervalles de température allant de 0 à 35°C avec un optimum de croissance de 20 à 35°C. C'est un groupe intermédiaire entre les psychrophiles et les mésophiles. Ils se caractérisent par un métabolisme lent et un temps de génération plus long que les mésophiles. On les rencontre souvent dans les aliments réfrigérés car ils y sont sélectionnés par le froid. Peu de psychrotrophes sont pathogènes, exemple : *Listeria monocytogenes*.

D'autres germes mésophiles ont aussi une activité à basse température : *Yersinia enterocolitica* se développe dans le lait jusqu'à 2°C dans le lait, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* type E peuvent produire leurs toxines dans les produits réfrigérés jusqu'à 6°C.

Thermotrophes et thermophiles :

Les thermotrophes sont asporogènes et thermosensibles. Ils ne poussent pas à 15°C et peuvent supporter des températures jusqu'à 75 et 80°C. Parmi ce groupe On trouve certaines bactéries lactiques comme : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus helveticus* qui ne se développent pas à 15°C, ont un optimum de croissance de 50°C et supportent un traitement thermique de 30min à 60° C.

Les thermophiles : poussent à des températures plus élevées. Ces germes ont en générale une température optimale de 68 à 70° C et résistent jusqu'à 80°C. On peut citer comme exemples :

Thermus aquaticus; *Thermomicrobium* (bactéries GRAM-);

Thermoanaerobacter (bactérie GRAM+).

Byscochlamys : moisissure thermophile toxigène dont les spores sexuées résistent à la pasteurisation. Elle peut provoquer des altérations des jus et des produits à base de fruits.

Les thermophiles thermorésistants : sont des bactéries sporogènes du genre Bacillus et Clostridium. Leur optimum de croissance est entre 55° et 65° C et ne se multiplient pas au-dessous de 37° C. Leurs spores ne germent qu'au-dessus de 55° C et résistent plusieurs heures à 100°C et quelques minutes à 130°C. Exemples :

Clostridium thermosaccharolyticum, C.coagulans, Bacillus stearothermophilus.

Les hyperthermophiles : ont un optimum de croissance supérieur à 80°C et ne peuvent pas se multiplier au-dessous de 60°C ; Exemples : *Aquifex pyrophilus* et les archaea et on ne connaît pas jusqu'à aujourd'hui d'hyper thermophiles en microbiologie alimentaire.

Tableau III : Classes de microorganismes basées sur les températures cardinales (M.Naitali et coll 2017)

Type	T min (°C)	T opt (°C)	Tmax (°C)
Psychrophiles	-18,-12,-10 *	10 à15	18 à 20
Psychrotrophes	-2 à 5	20 à 35	30 à 40
Mésophiles	5 à 10	25 à 40	44 à50
Thermotrophes	10 à30	40 à 46	50 à 55
Thermophiles	30 à 40	55 à 60	60 à 90

4-2-2-humidité relative :

Les microorganismes se développent plus rapidement dans une humidité relative élevée même à basse température. Quand les aliments secs sont mis à l'humidité, ils absorbent l'eau en surface ce qui permis finalement une croissance microbienne.

4-2-3-présence et concentration de gaz :

L'atmosphère, dans laquelle la nourriture est conservée est également importante.

. Une augmentation de la teneur en CO2 (jusqu'à 10 %) et une diminution de la teneur en oxygène permettent une meilleure conservation des fruits et légumes, en retardant le développement de certains microorganismes et plus particulièrement des moisissures. La conservation de la viande dans une atmosphère riche enCO2 inhibe les bactéries GRAM-, en produisant une population dominée par les Lactobacilles. Ces propriétés sont exploitées pour emballer les aliments sous atmosphère modifiée en vue de les conserver.

De même une atmosphère d'azote ou un conditionnement sous vide permet d'éviter des contaminations par des microorganismes aérobies.

4-2-4-Présence et activité d'autres microorganismes :

Certains microorganismes Produisent des substances qui sont inhibitrices ou létale pour les autres populations microbiennes. Parmi ces substances on trouve les antibiotiques, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène et les acides organiques (tel que l'acide lactique).

L'interférence entre les microorganismes est un phénomène qui permet l'élimination ou la destruction d'un microorganisme par les autres membres du même habitat ou environnement .IL est probablement lié à la compétition pour les nutriments ou les sites d'adhésion ou /et une altération de l'environnement.

Inversement, les modifications apportées au milieu par un premier germe dominant peuvent préparer le terrain pour le développement d'autres germes qui lui succéderont : Le développement d'un micro-organisme peut avoir pour conséquence de provoquer l'élimination de composés inhibiteurs, rendant le milieu propice au développement d'autres germes moins tolérants.

Les différents types d'interactions entre microorganismes sont donc soit positives (mutualismes coopération, commensalismes), soit négatives (amensalisme, parasitisme, prédation.) voir tableau III.

- **Neutralisme** : aucune population n'est affectée par la présence de l'autre
- **Commensalisme** : une population est favorisée l'autre n'est pas affectée
- **Mutualisme** : les deux populations tirent bénéfice de la présence de l'autre
- **Amensalisme** : une population est inhibée par la présence de l'autre, la seconde n'est pas affectée.
- **Parasitisme** : une population se développe au dépend de l'autre
- **Compétition** : les deux populations sont affectées.

Exemples d'interactions importantes dans les aliments :

Le yaourt résulte de l'action de 2 ferments lactiques : Streptococcus thermophilus produit des facteurs de croissance favorables à Lactobacillus bulgaricus, et vice-versa. Au début de la fermentation, ce sont surtout les streptocoques qui agissent (libération d'acides, d'adénine, et de CO₂) puis ils laissent progressivement la place aux Lactobacillus, plus résistants en milieu acide .Les Lactobacillus par leur activité protéolytique importante vont libérer des acides aminés et stimuler les streptocoques. Les 2 germes fermentent donc le lait plus vite et mieux qu'un seul c'est la coopération ou mutualisme.

Cette interaction positive ne va pas durer puisque l'augmentation de l'acidité du milieu liée à la multiplication des Lactobacillus va inhiber le Streptococcus : c'est

l'amensalisme. Un autre exemple d'amensalisme est celui de *Leuconostoc* et *Lactobacillus* qui synthétisent des bactériocines. Ces protéines, sont actives surtout contre les Gram- mais inhibent également les *Listeria* (Gram+).

Tableau IV : différents types d'interactions entre microorganismes.

Interaction	Population A	Population B	Exemples
Neutralisme	0	0	Niches écologiques différentes ou milieux riches : <i>Clostridium tyrobutyricum</i> et <i>Lactobacillus</i> dans les fromages à pâte pressée cuites
Commensalisme	0	+	Homme et microbiote intestinal
Coopération	+	+	<i>Lactobacillus Bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i> dans le yaourt
Synergisme ou mutualisme	+	+	Homme et microbiote intestinal, <i>Rhizobium</i> et plantes
Compétition	-	-	Entérobactéries et <i>Staphylococcus aureus</i> dans la viande
Amensalisme	0/+	-	Inhibition des flores bactériennes par l'éthanol produit par les levures
Parasitisme	+	-	Pathogénicité chez l'homme et bactériophage chez les bactéries

5-Altération microbienne des aliments :

Les microorganismes peuvent soit détériorer la qualité organoleptique des aliments (germes d'altération), ou bien conduire à leur conservation et à l'amélioration de leur qualité organoleptique (flore utile) soit provoquer des toxico-infections chez le consommateur (germes pathogènes et toxigènes).

La détérioration des aliments constitue un problème important dans toutes les sociétés. Elle peut se produire à n'importe quel stade de la production, du transport, du stockage ou de la préparation. Elle peut être :

- Physique : chocs, blessures, changements d'état, variation de la teneur en eau (comme un séchage), changement de couleur, etc.
- Chimique : oxydation (rancissement) ;

-Biochimique : par les enzymes (brunissement enzymatique, lyses, destruction des vitamines et de certains nutriments) ;

-Microbiologique : fermentation, développement de microorganismes pathogènes, production de toxines et d'enzymes (putréfaction, toxicité).

5-1 Modification de l'aspect et des caractères organoleptiques :

La prolifération microbienne s'accompagne généralement de la transformation de certaines substances et de la production de molécules nouvelles qui modifient le goût, l'odeur et l'aspect de la denrée. Ces modifications ne sont perceptibles qu'à partir d'un certain seuil. Les microorganismes de l'altération peuvent agir soit sur :

Les glucides par hydrolyse des polymères (amidon ; cellulose...) ce qui modifie la texture de l'aliment, ou par fermentation (glucose ; fructose, lactose, saccharose...) ce qui aboutit à la formation d'acides et de produit carbonylés modifiant ainsi le goût et l'arôme.

Les protides par hydrolyse, ce qui modifie la texture de l'aliment ; ou par décarboxylation, désamination, désulfuration etc...entraînant une modification du goût, de l'odeur et formation de catabolites toxiques.

Les lipides sont hydrolysés par des lipases extracellulaires pour produire du glycérol et des acides gras qui pourront par la suite être oxydés pour donner des hydro peroxydes puis des aldéhydes et des cétones.

L'altération des produits alimentaires peut se traduire par un changement :

5-1-1-L'odeur : c'est généralement le premier signe d'altération perceptible par l'homme. Ces modifications sont en relation avec une transformation de l'aliment par fermentation lactique, acétique, ou par production de composés organiques volatiles

Exemples :

Triméthylamine, mercaptan, ammoniac, AC. Butyrique, diacétyl,

Diméthylsulfures, Sulfures d'hydrogènes

5-1-2- La saveur : c'est le deuxième signe d'altération que l'homme peut détecter. La plus importante modification de saveur est l'acidification par le goût, observé surtout dans les aliments riches en sucre. Comme les fruits

5-1-3- La couleur : c'est le signe d'altération tardif qui nécessite une charge microbienne importante. Les modifications de couleur résultent d'un ou plusieurs phénomènes :

- synthèse d'un ou plusieurs pigments par le microorganisme. Toutes les couleurs sont possibles (blanc -noir - bleu - vert - jaune - rouge.). Les genres producteurs de pigments les plus souvent rencontrés sont : Micrococcus, Pseudomonas, Chromobacterium, Serratia, Bacillus, Flavobacterium, Rhodotorula.

- transformation d'un pigment endogène à l'aliment. Oxydation du carotène (perte de la couleur orange de nombreux produits végétaux), modifications de la myoglobine (dérivés nombreux de couleur marron à vert).
- destructions cellulaires mettant en contact enzyme et substrat (PPO-quinone). Ce phénomène est courant chez les produits végétaux. (La poly phénol oxydase catalyse la première étape du brunissement enzymatique qui transforme les composés phénoliques en produits quinoniques précurseurs des mélanines colorées.

L'acide chlorogénique et le catéchol présents dans de nombreux tissus végétaux sont des substrats de la polyphénol oxydase.)

- production d'un composant réactif et chromogène (H₂S générant des sulfures divers noirs).

5-1-4- La texture : l'aliment perd de sa fermeté (viande – poisson) et de sa rigidité (fruit – végétal – légumes) et changement de viscosité (lait – aliments liquide en général).

La structure d'un produit alimentaire est liée à la présence de macromolécules comme les pectines, Celluloses, hémicelluloses (amidon et protéines) chez les produits végétaux et les protéines chez les produits animaux. Si les microorganismes contaminants synthétisent et excrètent des hydrolases (pectinases, protéases etc...) Un ramollissement apparaît. Pour un germe donné, ce ramollissement est d'autant plus grand que la charge microbienne est élevée. La production de gaz (CO₂ le plus souvent) induit la formation de fissures ou de bulles et altère les emballages. La synthèse de polymères (dextranes à partir de saccharose avec *Leuconostoc*) augmente la viscosité de certains sirops ou jus. Ou à l'origine d'une consistance filante des laits (*Micrococcus* et *Alcaligenes*)

5-1-5- La valeur nutritionnelle : la consommation des constituants en protéine, vitamine, glucide, lipide etc... par les micro-organismes fait perdre ces valeurs nutritionnelles d'origine aux aliments.

Ces mêmes microorganismes ont un rôle favorable en synthétisant des molécules à activité biologique comme des vitamines ou encore en catabolisant des produits toxiques ou antinutritionnels (glucides non fermentescibles C1-C6 : stachyose, protéines toxiques).

5-1-6 relation entre Conditions de conservation et composition de l'aliment et le type de microorganismes d'altération :

Pour les produits conservés au froid, les altérations sont naturellement dues aux germes psychrotrophes (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, Levures, Moisissures, certains *Lactobacillus* et Coliformes).

Pour les produits très chauffés, seuls les sporulés résistent : *Clostridium* et *Bacillus* ; et les premiers (anaérobies stricts) ne peuvent se développer que dans les produits privés d'oxygène, sous-vide ou sous atmosphère modifiée.

Seuls les germes résistant aux basses Aw produiront des altérations dans les produits séchés, très salés, ou très sucrés : Micrococcus, Staphylococcus, certains Lactobacillus, Levures et Moisissures.

L'absence d'air favorise les micro-aérophiles (Lactobacillus) et les anaérobies (Clostridium).

Les milieux sucrés sont propices aux Levures (carottes), les milieux protéiques (viandes, poissons) sont propices aux altérations protéolytiques.

Une altération peut devenir dangereuse pour la santé, notamment dans le cas de protéolyse où il peut apparaître des métabolites toxiques : ptomaïnes (cadavérine, putrescine, histamine).

5-2 Exemples d'altération alimentaires :

5-2-1 Altération du lait :

Le lait aliment à haute valeur nutritive est un milieu parfait pour la multiplication bactérienne.

Le lait même prélevé aseptiquement contient un grand nombre de microorganismes (1000 à 5000 microorganismes par ml).

Le lait non pasteurisé s'altère en une succession de quatre étapes :

1. Production d'acide par *Lactococcus lactis*, Production supplémentaire d'acides par des microorganismes plus tolérants aux acides comme Lactobacillus, l'acidité du lait précipite la caséine et provoque la mise en masse du lait .
2. Prolifération des levures et de moisissures qui dégraderont l'acide lactique accumulé, ce qui diminue l'acidité,
3. Les bactéries protéolytiques (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*...) entrent en action et donnent une odeur putride et un goût amer. Le lait au départ opaque peut devenir limpide.
4. De nombreuses bactéries lipolytiques comme *Pseudomonas* et *Bacillus cereus* dégradent également les lipides. Les acides gras insaturés résultant de la lipolyse peuvent être oxydés (rancissement).

Il convient de mentionner que certaines bactéries peuvent causer le filage du lait par la production de dextrans (*Alcaligenes viscosus*) ou de mucilages (*Leuconostoc mesenteroides*). D'autres peuvent le colorer le lait en jaune (*Flavobacterium*), en rouge (*Brevibacterium*, ou en bleu (*pseudomonas syncyanea*) .

5-2-2 Altération de la viande :

Les produits carnés sont riches en eau, en protéines et en graisses. La détérioration des viandes peut être autolytique (par les enzymes) ou microbiologique.

Les micro-organismes de la flore intestinale sont la principale source de contamination de la viande et du poisson. Ils contiennent souvent, en plus des germes d'altération, des espèces potentiellement pathogènes.

Les bactéries du genre *Clostridium* interviennent en profondeur et dégradent le glycogène ou les protéines et libèrent du CO₂ et provoquent une putréfaction sulfhydrique et ammoniacale ce qui produit des odeurs désagréables.

L'altération superficielle conduit à la formation d'un enduit muqueux en surface (limon de putréfaction) et également d'odeurs désagréables. Parmi les germes responsables : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Escherichia* et *Staphylococcus*.

Certaines altérations sont dues à des germes spécifiques : par exemple, le verdissement des viandes cuites (jambons) est provoqué par *Lactobacillus viridescens*

5-2-3 Altération des fruits :

La flore microbienne des fruits et des légumes est constituée presque exclusivement des bactéries de l'environnement. Accidentellement peuvent s'y ajouter des microorganismes pathogènes provenant du fumier, de l'eau ou des manipulations (staphylocoques, *Yersinia*, *Campylobacter*, des parasites ou des virus).

Les bactéries n'altèrent pas les fruits, à cause de leur pH acide, mais elles donnent chez les légumes la pourriture molle (*Erwinia*, *Pseudomonas*). De même les bactéries cellulolytiques ou pectinolytiques peuvent détruire la paroi pectocellulosique (*Cellulomonas*, *Arthrobacter*) ce qui produit des zones de consistance visqueuse.

Les champignons peuvent altérer les fruits et les légumes entraînant l'apparition de zones colorées puis la dissociation des tissus sous-jacents. On peut citer comme exemples d'altérations fongiques :

La pourriture bleue ou verte : *Penicillium*

La pourriture verte : *Trichoderma*

La Pourriture bleu : *Phytophthora*

La dégradation visqueuse des légumes peut aussi être le fait de moisissures cellulolytiques et pectinolytiques : *Fusarium*, *Aspergillus*.

Le développement fongique dans les céréales et les grains peut provoquer des intoxications alimentaires graves, liées à la production d'aflatoxines et de fumonisines.

6-Contrôle de la détérioration des aliments :

Différentes méthodes physiques et chimiques permettent de conserver les aliments, parmi lesquelles la filtration, la modification de la température, le séchage, l'addition de produits chimiques, l'irradiation et la fermentation (tableau IV)

6-1 La microfiltration :

Dans l'industrie agroalimentaire, la filtration sur membrane est une technique de pointe de clarification, de concentration, de fractionnement (séparation de différents éléments), de dessalage et de purification employée dans la fabrication de plusieurs boissons. Elle sert également à améliorer la sécurité des aliments, tout en évitant de les soumettre à un traitement thermique.

Les microorganismes de l'eau, des jus, des boissons non alcoolisées, et des bières peuvent être éliminés par filtration sur des membranes de porosité 0,1 à 10µm, un pré-filtre et une centrifugation peuvent augmenter l'efficacité et la durée de vie des filtres. Cette technique réduit fortement ou élimine complètement les populations bactériennes.

Pour le lait la microfiltration se fait sur le lait écrémé, pour éviter l'obturation des pores, puis le beurre pasteurisé est incorporé à la teneur désirée.

6-2 Les basses températures :

La conservation des aliments à basse température doit se faire sur des produits en bon état. On distingue la réfrigération, la congélation et la surgélation. La réfrigération se fait à des températures entre 0 et 4°C. A des températures proches de 0°C, les micro-organismes subissent des désordres métaboliques et des lésions cellulaires pouvant être importantes. Cet état physiologique de "stress froid" est principalement la conséquence d'une fragilisation des liaisons hydrophobes, ce qui entraîne la modification de la structure quaternaire induite par la réfrigération. Il en résulte une perte de fonctionnalité des protéines enzymatiques, par modification de leur conformation dans l'espace. La structure quaternaire est profondément modifiée. L'assemblage des ribosomes est inhibé, ce qui provoque une diminution des synthèses protéiques. La fluidité des membranes est réduite et l'ensemble des fonctions membranaires telles que le transport des ions ou des nutriments s'en trouve affectés.

La réfrigération ne fait que retarder le développement microbien. Cette méthode a des limites car les psychrophiles peuvent se développer si la conservation est prolongée et induire une altération.

La congélation est une conservation à une température inférieure à -12°C.

La surgélation est une conservation à une température inférieure à -18°C.

Tableau V : Méthodes de base de la conservation des aliments.

Technique générale	Exemples de méthodes
Élimination des microorganismes	Limitation de la contamination microbienne : - Filtration - Centrifugation
Basse température	Réfrigération Congélation
Haute température	Inactivation thermique partielle ou complète des microorganismes : - Pasteurisation - Mise en conserve
Élimination de l'eau	Lyophilisation Utilisation d'un atomiseur avec de l'air chaud ou d'un séchoir à chaud
Diminution de la disponibilité de l'eau	Addition de solutés comme le sel ou le sucre pour diminuer les valeurs d' <i>a_w</i>
Conservation chimique	Addition de composés inhibiteurs spécifiques (acides organiques, nitrate, anhydre sulfureux)
Irradiation	Utilisation de radiations ionisantes ou non ionisantes (UV)

L'activité métabolique de la plupart des germes commensaux ou pathogènes est inhibée aux températures inférieures au point de congélation mais il faut descendre à -18°C pour stopper totalement le développement des levures et des moisissures. Cet arrêt de croissance est lié à une cristallisation de l'eau contenue dans les aliments ce qui diminue la disponibilité en eau et donc abaisse *A_w*.

Le froid ne tue pas les microorganismes et ne détruit pas les toxines. Dès le retour des températures élevées les microorganismes peuvent reprendre leur activité.

6-3 Les températures élevées :

Le contrôle des populations microbiennes dans les aliments par la chaleur peut limiter considérablement la transmission des maladies et le pourrissement. Les températures élevées peuvent inactiver les enzymes microbiennes les spores et tuer les microorganismes.

La pasteurisation : implique un chauffage des aliments à des températures qui détruisent les germes pathogènes. Ce chauffage est suivi d'un brusque refroidissement. On distingue :

La pasteurisation à basse température LTH (low temperature holding), méthode utilisée pour le lait, les jus de fruits et la bière, qu'on maintient à de températures de 62,8°C pendant 30 minutes.

La pasteurisation à haute température HTST (high temperature -short time) les produits sont alors traités à 71°C pendant 15 secondes.

Les aliments pasteurisés doivent être conservés à 4°C et parfois on peut ajouter des conservateurs pour augmenter la durée de leur conservation.

La stérilisation : c'est une destruction totale de tout germe et spore dans l'aliment.

La stérilisation des aliments ou appertisation a été instaurée par Nicolas Appert au 18^{ème} siècle. Elle consiste à conditionner les aliments dans des récipients étanches à l'air, à l'eau et aux microorganismes, puis les chauffer à environ 115°C pendant 25 à 100 minutes. Le temps et la température exacts dépendent de la nature de l'aliment. Ce traitement thermique altère le goût des aliments.

Le traitement à ultra haute température (UHT) consiste à chauffer le produit à une température assez élevée, entre 135°C et 150°C, pendant un temps très court, entre 1 à 5 secondes. Ce procédé met en œuvre soit le chauffage indirect dans des échangeurs tubulaires ou à plaques soit le chauffage direct par contact entre le produit et de la vapeur d'eau sous pression. Le produit stérilisé est ensuite refroidi puis conditionné aseptiquement. Ce processus est utilisé pour la stérilisation des produits liquides (lait, jus de fruits, ...) ou de consistance plus épaisse (desserts lactés, crème, jus de tomate, soupes).

Destruction thermique :

La pasteurisation ainsi que la stérilisation sont des procédés impliquant des traitements thermiques. Lors de la destruction thermique, c'est un peu le phénomène inverse de la croissance microbienne qui se produit. À une température de stérilisation donnée, le nombre de germes décroît exponentiellement en fonction du temps selon l'équation suivante. N_0 est la population initiale, N est la population finale et t est le temps. La valeur k est une constante. Elle varie selon le type de microorganismes et selon la température de stérilisation.

$$\text{Log} \frac{N_0}{N} = k \cdot t$$

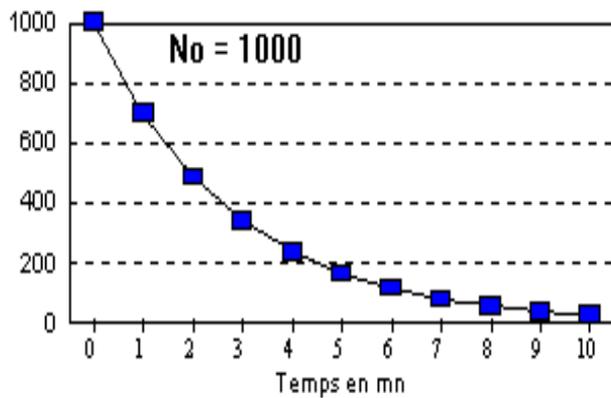


Figure 2 : Courbe de destruction bactérienne à une température létale donnée

-Le temps de destruction thermique D(min) : est le temps nécessaire pour atteindre la stérilité commerciale à une température de stérilisation donnée. Le temps de réduction décimale (D) est le temps nécessaire pour réduire de 90 % le nombre initial de microorganisme (Figure3). D ne dépend que de la nature du germe (voir tableau V)

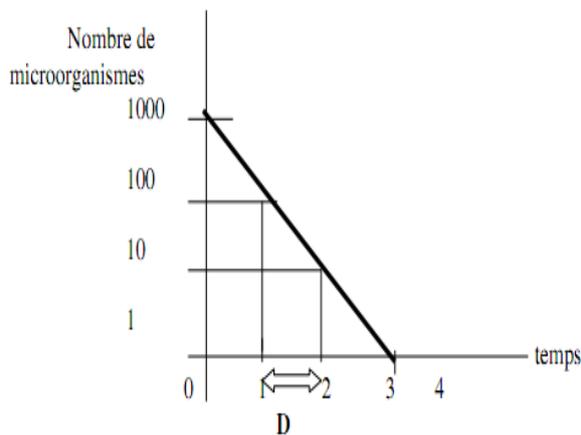


Figure 3 : Temps de réduction décimale

Une augmentation de la température a pour effet une diminution de la valeur de D (figure 4)

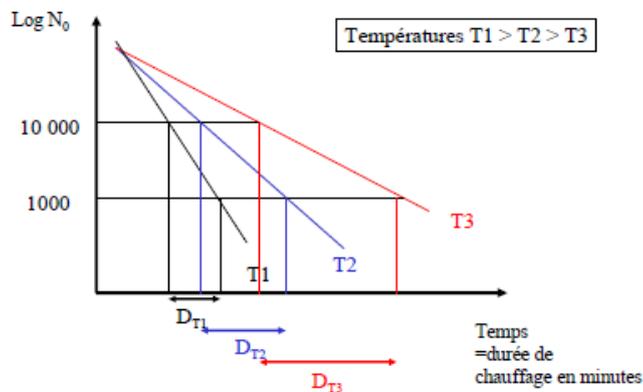


Figure 4 : influence de la modification de température sur la valeur D

-La **valeur d'inactivation thermique Z** : désigne la variation de la température qui entraîne une

Variation du temps de réduction décimale d'un facteur 10, s'exprime en °C.

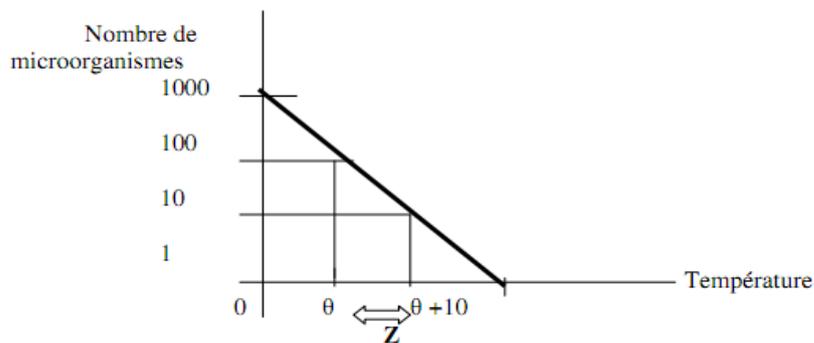


Figure 5 : Valeur d'inactivation thermique

La connaissance de Z et d'une valeur DT suffit à caractériser entièrement la thermo résistance d'une souche bactérienne.

On peut donner à titre indicatif des ordres de grandeur du paramètre z pour des suspensions microbiennes en milieux aqueux

Z ≈ 5°C pour des levures, moisissures et bactéries sous forme végétative

Z ≈ 10°C pour des spores de bactérie.

Tableau VI : valeur de la destruction thermique D_t pour quelques germes

Température (°C)	Microorganismes	D(minutes)
60	<i>Campylobacter jejuni</i>	1
60	<i>Salmonella spp</i>	2
60	<i>Listéria monocytogenes</i>	1-6
60	<i>Staphylococcus aureus</i>	2
60	<i>Aspergillus niger</i>	1
100	<i>Bacillus cereus</i>	0,5- 0,30
121	<i>Clostridium botulinum</i>	0,21
121	<i>Clostridium sporogenes</i>	0,8
121	<i>Bacillus</i> <i>Stearothermophilus</i>	3

6-4 La disponibilité en eau

La déshydratation, comme la lyophilisation qui produit des aliments congelés à sec est un moyen d'empêcher le développement microbien .le procédé moderne est une amélioration des techniques anciennes de séchage des céréales, des viandes ,du poisson et des fruits. La combinaison de la perte d'eau libre avec une augmentation de la concentration en soluté dans l'eau restante permet ce type de conservation.

Selon l'intensité de la déshydratation on distingue :

- **la concentration** qui consiste à augmenter la masse d'un produit par unité de volume et peut être réalisé par déshydratation partielle.

- **le séchage** qui consiste à enlever l'excès d'humidité par évaporation de l'eau.

- **la lyophilisation** consiste à congeler un aliment puis à le soumettre au vide, l'eau passe ainsi directement de l'état solide à celui de vapeur, c'est la sublimation de la glace. On peut décomposer la lyophilisation en trois étapes principales :

- congélation (au-dessous de -20°C)

- dessiccation primaire ou sublimation et récupération de la vapeur d'eau

- Dessiccation finale ou séchage secondaire: une fois toute la glace est sublimée une augmentation de la température entre 20 et 70°C pendant 2 à 6 heures permet une diminution l'eau résiduelle à une valeur entre 2à 8%.

Cette technique qui donne des produits de qualité se réhydratant bien, reste d'un prix de revient élevé. Elle est réservée à certaines applications comme le café soluble, certains potages instantanés et l'alimentation de personnes en conditions extrêmes (astronautes, alpinistes ...).

- **Le fumage ou fumaison** consiste à soumettre une denrée alimentaire à l'action des composés gazeux qui se dégagent lors de la combustion de végétaux. La fumée produite par la combustion du bois contient des substances fongistatiques qui inhibent la croissance des moisissures et des levures à la surface du produit. Le fumage joue plusieurs rôles : aromatisation et coloration, préservation par effet antimicrobien et modification de la texture du produit. Il s'applique principalement aux produits carnés pour lesquels le séchage suivi du fumage permet de conserver les viandes et poissons grâce à l'action combinée de la déshydratation et des antiseptiques contenus dans la fumée.

Des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) peuvent se trouver dans les viandes fumées (ou grillées) ; le jambon fumé peut contenir jusqu'à 3 µg de benzo(a)pyrène/kg mais la réglementation accorde une teneur maximale de 1 µg/kg de ce produit dont le pouvoir mutagène et cancérigène a été prouvé.

- **La conservation par le sel ou salage** consiste à soumettre une denrée alimentaire à l'action du sel par un salage à sec soit par saumurage.

L'opération de salage consiste à répandre directement du sel à la surface d'une denrée à traiter, à raison d'environ 15 % de son poids, pour en provoquer la déshydratation et ainsi empêcher le développement de bactéries. La solubilisation des protéines animales donne aux produits carnés une saveur caractéristique, une texture et une couleur agréables.

Le saumurage consiste à immerger plus ou moins longtemps une denrée dans une saumure composée de sel, d'eau et de divers additifs (aromates, sucres, nitrates,). La saumure agit par osmose : une partie du sel migre dans l'aliment, la concentration en sel de ses tissus s'équilibrant avec celle de la saumure

En diminuant l'activité de l'eau du produit, ce procédé permet de freiner ou de bloquer le développement microbien. Cette technique est essentiellement utilisée en fromagerie, en charcuterie et pour la conservation de certaines espèces de poissons (harengs, saumon, ...). Elle est parfois associée au fumage.

- **La conservation par le sucre** ne peut se faire qu'à chaud puisque l'aliment doit perdre une partie de l'eau qu'il contient par évaporation tandis que le sucre, une fois dissous, se lie aux molécules d'eau et les rend indisponibles pour la croissance de microorganismes.

6-5 Les substances chimiques

Différents agents chimiques sont utilisés pour conserver les aliments. Ils comprennent des acides organiques simples, les sulfites, l'oxyde d'éthylène comme gaz stérilisant, le nitrate de sodium, et le formiate d'éthyle. Ces agents chimiques affectent les micro-organismes en agissant soit par altération de la membrane plasmique, soit par dénaturation des protéines cellulaires ou en agissant sur le fonctionnement des acides nucléiques ce qui arrête la reproduction microbienne.

L'efficacité de plusieurs additifs dépend du pH de l'aliment par exemple le propionate de sodium est plus efficace à faible pH.

Le nitrite de sodium est utilisé pour la conservation des produits carnés .il protège contre le botulisme en inhibant la croissance de Clostridium botulinum et la germination de ses spores(tableau VI) . Récemment il a été découvert que le nitrite réagit avec des amines et forme des nitrosamines cancérigènes.

Un grand nombre de conservateurs (E) actuellement autorisés sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII : Exemples de conservateurs les plus couramment utilisés.

Nombre E	Substance/Classe	Exemples d'aliments conservés
E200-203	Acide sorbique et sorbates	Fromages ,vins, fruits séchés ,purées de fruits
E210-213	Acides benzoïques et benzoïates	Légumes au vinaigre, confitures et gelées faible teneur en glucides, sauces
E220-228	Dioxyde de soufre et sulfites	Fruits secs fruits en conserve et vin
E235	Natamycine	Traitement de surface des fromages et des saucissons
E249-252	Nitrites et nitrates	Produits à base de viandes
E282	Propionate de calcium	Prévient le développement des moisissures sur le pain et les aliments cuits

D'autres additifs alimentaires sont des antioxydants qui empêchent l'altération des aliments par oxydation (oxygène, air, lumière ou enzymes).

Le consommateur accepte mieux la conservation par des substances présentes naturellement. Certaines substances naturelles à effet antimicrobien sont ainsi utilisées :

Le lysozyme (E1105) : agit sur les GRAM+ mais pas sur les GRAM-, La lactoperoxydase (présente dans le lait, le colostrum, la salive...), L'ovotransferrine (présente dans l'œuf), La lactoferrine (lait) les composés phénoliques et acides organiques de nombreux végétaux(épices).

6-6 Les radiations :

Les radiations ionisantes correspondent à des rayonnements électromagnétiques possédant une énergie associée supérieure à 10 eV, En dessous de cette valeur en énergie les radiations sont dites non ionisantes et on y classe notamment les rayonnements infra -rouges, ultraviolet ou encore les champs électromagnétiques de très basse fréquence(micro-onde).

Grace à l'énergie qui leur est associée, les radiations ionisantes sont capables de déplacer les électrons des atomes et molécules et les convertir en ions.

L'irradiation des denrées alimentaires améliore leur conservation. Elle peut se faire par trois types de rayons :

Les rayons X : produits par des appareils fonctionnant à un niveau d'énergie égal ou inférieur à 5MeV

Electrons accélérés : obtenues par des systèmes fonctionnant à un niveau d'énergie inférieurs ou égal à 10 MeV

Les rayons γ obtenus par des isotopes radioactifs, il s'agit soit du cobalt 60, soit du césium 137.

Les radiations ionisantes agissent sur l'ADN et l'ARN des micro-organismes ce qui bloque leur croissance et conduit à leur mort. Selon la dose appliquée on a :

- La radurisation : dose (entre 1 et 5Kgray) on réduit la charge microbienne sans altérer le gout de l'aliment.
- La radication : dose qui élimine la flore pathogène et d'altération (< 10 Kgray)
- La radappertisation : stérilisation par irradiation entre 20 et 50 Kgray .

Cette méthode est utilisée pour la conservation des grains, des fruits secs et des légumes et aussi pour la conservation et une meilleure hygiène des viandes peu grasses et des poissons.

Cette technique présente des inconvénients :

-destruction de vitamines.

-formation de radicaux libres qui peuvent altérer les caractères organoleptiques des aliments et peuvent agir sur la santé du consommateur.

- Recourt aux technologies nucléaires qui ont des impacts négatifs sur l'environnement.

6-7 Les bactériocines :

Les bactériocines sont des molécules peptidiques secrétées naturellement par certaines bactéries et actives sur les bactéries étroitement apparentées. Elles jouent un rôle important dans la compétition entre bactéries et ont un effet bactéricide ou bactériostatique. Elles agissent sur la membrane des bactéries sensibles en formant des ports hydrophiles, ce qui permet aux molécules de faible poids moléculaire de s'échapper entraînant la mort cellulaire.

Le seul produit qui peut être utilisé d'une façon légale est la nisine (E234). La nisine est produite par certaines souches de *Streptococcus lactis*, elle n'est pas toxique pour l'homme et touche principalement les bactéries gram+, surtout *Streptococcus faecalis*.

Selon leurs caractéristiques structurelles et leurs activités biologiques, on distingue trois classes de bactériocines :

- Classe I : les lantibiotiques (taille < 5 KDa) renferment dans leur séquence des acides aminés inhabituels tels que la lanthionine et la β -méthyl-lanthionine ;
- Classe II : petits peptides non lantibiotiques (taille < 10 KDa) thermorésistants ;

– Classe III : protéines thermolabiles de poids moléculaire supérieur à 30 KDa.

Les bactériocines inhibant la flore indésirable et les bactéries Gram+ potentiellement pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, sont produites par différentes espèces de cultures protectrices comme :

- *Lactobacillus sakei* - *Lb. curvatus* *Lb. plantarum* *Lb. casei* .

- *Pediococcus acidilactici*

- *Lactococcus lactis*

- *Enterococcus faecium*

-*Staphylococcus xylosum* , *Staphylococcus carnosus*

6-8 Hautes pressions :

Le traitement par haute pression (HPP : high pressure processing),ou Pascalisation également appelé Pasteurisation à froid consiste à appliquer une pression sur un liquide dans lequel le produit d'intérêt est émergé .cette pression peut atteindre 6000 fois la pression atmosphérique.

Les hautes pressions agissent sur la structure cellulaire notamment les protéines et les membranes bactériennes.

Cette technique à l'avantage de conserver l'aliment sans altérer ses qualités organoleptiques mais aucune étude n'a été faite pour étudier la toxicité et la modification de la valeur nutritionnelle des aliments traités.

6-9 La fermentation et la bio-préservation :

La fermentation est une méthode ancestrale pour la conservation des aliments. Actuellement elle repose sur l'utilisation contrôlée de microorganismes sélectionnés.

La préservation des aliments par fermentation repose sur l'effet de la diminution du pH par production d'acides organiques (fermentation lactique) ou sur l'effet de l'alcool (fermentation alcoolique) sur les microorganismes.

La bio-préservation consiste à inoculer un produit par des bactéries sélectionnées pour leur aptitude à inhiber le développement de germes pathogènes et / ou d'altération et ainsi prolonger sa date de péremption, sans modifier ses qualités organoleptiques.

Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour cette technologie car elles produisent souvent une large gamme de composés inhibiteurs (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, reuterin ...). De plus elles ont souvent le statut GRAS (generally recognise as safe) par l'US-FDA. (united states Food and Drug Administration) .

6-10 Combinaison entre les facteurs :

L'association entre les différents facteurs est importante car elle renforce l'effet des facteurs pris séparément. Ainsi par exemple l'effet inhibiteur du pH peut être plus important si on l'associe à un autre paramètre (température, Aw.) . Dans le cas de microorganismes en présence de plusieurs facteurs dont les valeurs sont sub-inhibitrices, on parle d'effet barrière. Chaque facteur est une nouvelle barrière que le microorganisme doit franchir mais qui l'épuise petit à petit (figure 6)

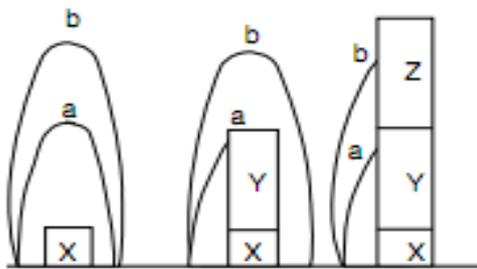


Figure 6 : présentation schématique montrant l'effet de la combinaison de plusieurs méthodes de conservation (X, Y, Z). Sur les populations microbiennes (a, b)

7- Fermentations et flores technologiques utiles pour la fabrication des aliments

La fabrication d'un grand nombre de produits alimentaires s'appuie sur le métabolisme de microorganismes que l'on regroupe sous le terme de flore positive.

Cette flore intervient dans l'élaboration de certains aliments par fermentation et /ou contribution au processus d'affinage.

Elle joue un rôle important dans la conservation et dans l'acquisition des propriétés sensorielles du produit.

La transformation des aliments par les microorganismes ou fermentation est une méthode ancestrale utilisée d'une façon empirique par les égyptiens et les sumériens 8000ans avant JC.

Ce n'est qu'au 19^{ème} siècle que Pasteur a mis en évidence que la fermentation se fait par des microorganismes comme *Saccharomyces cerevisiae*.

La fermentation est définie actuellement comme un processus métabolique qui convertit, en anaérobiose, les sucres en : acides, gaz, ou alcools. C'est une transformation chimique des substances organiques en des composés simples sous l'action d'hydrolases produite par des microorganismes comme les levures ou les bactéries.

Elle a été, au départ, développée pour la stabilisation des aliments, ensuite la technique a évolué de la stabilisation vers la création de nouveaux produits alimentaires avec des caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et fonctionnelles désirées. Les métabolites bactériens sont également utilisés comme additifs alimentaires. Certaines cultures bactériennes sont aussi utilisées comme probiotiques.

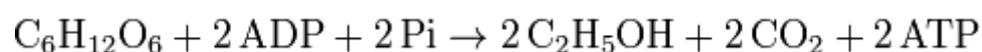
Au cours de ce processus les électrons et les protons issus de l'oxydation du potentiel réducteur de NADH⁺, H⁺ ne sont pas transférés à l'oxygène mais au pyruvate ou à l'un de ses dérivés.

Le substrat n'est pas dégradé complètement est la production en ATP est faible

7-1 Les principales fermentations alimentaires :

Selon le type du produit final on distingue plusieurs types de fermentations (tableau VII) :

La fermentation alcoolique réalisée par des levures du genre *Saccharomyces* conduit à la libération d'alcool. Elle est à la base de la production de la bière, du cidre, du pain et du vin la réaction est comme suit :



Glucose

éthanol

La fermentation lactique réalisée par des bactéries dites lactiques conduit à la production d'acide lactique.

La fermentation est dite naturelle quand les microorganismes qui interviennent dans la fermentation sont ceux qui se trouvent normalement dans l'aliment. Ce type de fermentation à l'inconvénient de ne pas toujours donner des produits de la même qualité ; de la même odeur et saveur en plus du risque de développement de pathogènes dans l'aliment.

La fermentation est dite contrôlée lorsque des cultures pures de microorganismes sélectionnés sont utilisés au cours de la fermentation du produit stérilisé ou pasteurisé. Ces microorganismes doivent produire les effets souhaitables sur l'aliment fermenté et ne présenter aucun risque sur la santé du consommateur. Elles sont appelées levains ou « starter culture ». On peut utiliser un seul microorganisme ou combiner plusieurs.

Les principaux genres bactériens utilisés comme levains sont : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Acetobacter*, *Oenococcus*, *Brevibacterium*.

Saccharomyces cerevisiae est la levure la plus utilisée comme levain (pain, boissons alcoolisées...).

Les champignons les plus utilisés en fermentation appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Mucor*.

7-2 Intérêt des fermentations

La fermentation transforme le produit en modifiant, généralement, dans un sens favorable ses propriétés.

La valeur alimentaire peut être améliorée par :

- Destruction de substances toxiques () ou indigestes (lactose)
- Apparition de facteurs de croissance d'origine microbienne (vitamines, acides aminés).
- Modification généralement favorable de la composition chimique.
- Amélioration de la qualité organoleptique (arôme, flaveur...)
- Amélioration de la texture.
- Meilleure conservation et stabilisation du produit par :
- Élimination de substances aptes aux développements de microorganismes indésirables
- Effet de masse de la flore technologique sur l'implantation de contaminants
- Production de substances à effet stabilisants ou antimicrobien (acides organiques, alcools peroxyde d'hydrogène, bactériocines et peptides antimicrobiens)

7-3 Principaux aliments fermentés

Plus de 3500 aliments et boissons fermentés dans le monde. Les principaux aliments fermentés sont :

- Les légumes : fèves, soja, manioc, olives, cornichons, choux...
- Les céréales, le pain
- Les produits laitiers : yaourt, fromages
- Les viandes
- Les poissons
- Les boissons fermentées : boissons alcoolisées, thé, café, cacao (feuilles ou fèves fermentées).

7-3-1 Le pain

Traditionnellement le pain est fermenté, de façon empirique par les microorganismes qui se trouvent naturellement sur la farine. Il s'agit de levures : *saccharomyces cerevisiae* et des bactéries lactiques. Dans ce cas le temps de fermentation est long ce qui favorise la synthèse des arômes et le développement des bactéries lactiques.

Actuellement on utilise des ferments commercialisés :

- *Saccharomyces cerevisiae* (levure boulangère): le temps de fermentation est court mais mois d'arômes
- Ferments mixtes : *S.cerevisiae* *Lb.brevis* et *Lb .fermentis* (les acides produits sont précurseurs d'arômes)
- La production de CO₂ lors de la fermentation panaire permet la production de la mie et des alvéoles.

7-3-2 Les produits laitiers fermentés

Plusieurs types de produits laitiers fermentés : Yaourt, Fromages, Beure, Kéfir, Koumis, leben

Le yaourt :

C'est un lait fermenté avec deux bactéries homofermentaires :

- *Streptococcus thermophilus* (transformation du lactose en acide lactique)
- *Lactobacillus delbruecki bulgaricus* (production d'acide lactique et activité protéolytiques et lipolytiques)

La teneur en ferments viables à la commercialisation doit être supérieure à 10^7 germes /g de produit. La teneur en acide lactique doit être égale à 0,7g/100 g de produit.

Lactobacillus et streptococcus acidifient le lait par production d'acide lactique.

Les lactobacillus possèdent en outre une activité protéolytique (goût peptone du yaourt) et lipolytique

Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus sont symbiotiques. Les acides aminés produits par l'hydrolyse de la caséine favorisent la croissance de streptocoque et l'acidité produite par son développement engendre un environnement favorable à la croissance de lactobacillus.

Les fromages :

La production du fromage se fait en trois étapes :

- Production du caillé
- L'égouttage et
- L'affinage

Il existe plusieurs types de fromages : fromages à pâte molle, à pâte persillées, à pâte pressée, à pâte fraîche. Chaque type de fromage possède une flore spécifique qui intervient au cours de la fermentation et de l'affinage. Cette flore se compose de bactéries, de diverses moisissures et de quelques levures.

La coagulation du lait peut se faire par acidification du lait ou par certaines enzymes de coagulation du lait telles que la rénine ou la présure (obtenue de l'estomac du veau ou actuellement par des microorganismes génétiquement modifiés). L'acidification du lait peut se faire par l'ajout de bactéries sélectionnées qui fermentent le lactose en acide lactique telles que Streptococcus lactis, Lactobacillus crémoirs, Lactobacillus bulgaricus. Certaines de ces bactéries restent piégées dans le lait caillé et interviennent dans la maturation.

Le caillé une fois séparé du lactosérum est mis en forme, ce processus implique un ajustement de pH, un salage.

Les bactéries du fromage :

Trois groupes de bactéries sont trouvées dans les fromages :

- **Les bactéries lactiques** : flore normale du lait (Streptococcus, Lactobacillus et Leuconostoc). Le rôle de ces bactéries est représenté dans le tableau VIII.
- Les bactéries de surfaces : flore de contamination principalement apportée par la saumure. Elles sont protéolytiques et dégradent la caséine et les acides aminés et sont également lipolytiques.

➤ **Les bactéries d'affinage :**

- *Propionibacterium* : affinage de certains fromages comme l'emmenthal. Elles fermentent le lactose résiduel avec production d'acide propionique, d'acide acétique et de CO₂ (trous de l'emmenthal)

- *Micrococcus et Staphylococcus* : amélioration de la texture et de l'arôme et stimulation des bactéries lactiques.

- *Corynebacterium*

- *Bifidobacterium*

Tableau IX : Bactéries lactiques dans la production des fromages.

Groupes	Espèces	Rôle
Streptococcus	<i>S.Lactis</i> <i>S.Cremoris</i> <i>S.Diacetylactis</i> <i>S.thermophilus</i>	Production : D'acide lactique (caillage du lait) Faible quantité d'aldehydes et d'acides volatiles(arôme)
Lactobacillus	<i>L.Bulgaricus</i> <i>L.Plantarum</i> <i>L.Casei</i> <i>L. thermophilus</i>	Homofermentaires pour la plupart Rôle essentiel au cours de l'affinage Production d'arômes
Leuconostoc		Hétérofermentaires, Produisent : L'éthanol et des acides organiques à partir du lactose Le diacétyl à partir du citrate CO ₂ Constitution de l'arôme et de la saveur

Les champignons microscopiques des fromages :

➤ **Les levures :**

Seules certaines espèces peuvent se maintenir dans le caillé. Elles produisent des composés d'arôme.

Exemple : *Geotrichum candidum*

Kluyveromyces(*lactis/marxianus*)

Debaryomyces hansenei

➤ **Les moisissures :**

Elles jouent un rôle actif dans l'affinage de certains fromages. Elles sont lipolytiques et protéolytiques. Le métabolisme de la caséine et des lipides du caillé produit de nombreux composés qui donnent au fromage son caractère organoleptique .la plupart consomment l'acide lactique ce qui désacidifie le fromage et lui donne sa texture définitive.

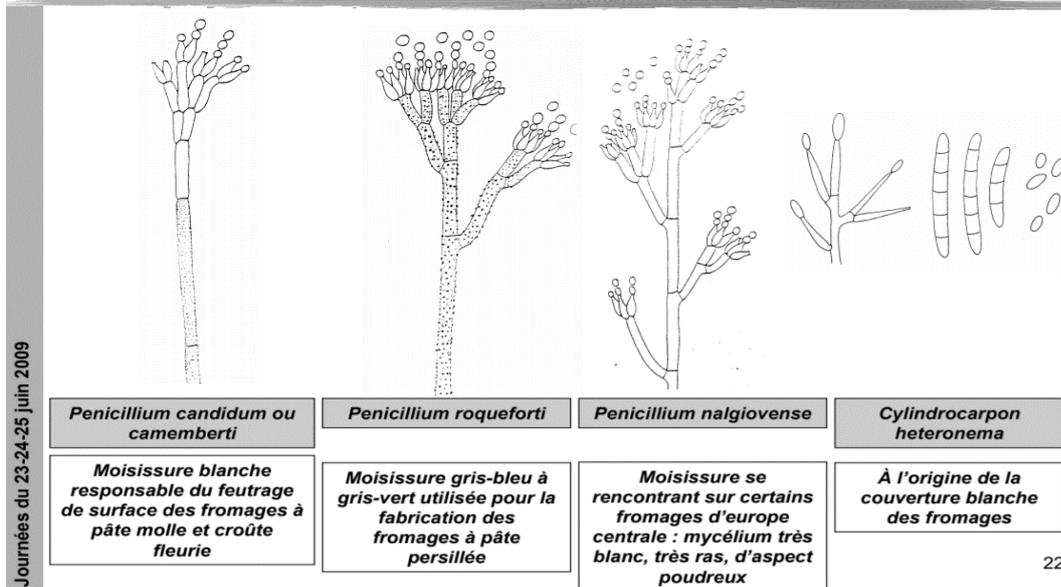
Exemples : *Penicillium camembertii* et *Geotrichum* dans le camembert. *Penicillium roquefortii* dans les fromages à pâte persillée : roquefort, bleu d'Auvergne, gorgonzola...

Tableau X : microorganismes intervenant dans la fermentation du fromage.

Bactéries Lactiques	Bactéries d'affinage	Levures et moisissures
Lactococcus lactis Ssp lactis(biov.diacetylactis) Ssp cremoris Leuconostoc Streptococcus Thermophilus Lactobacillus Delbruekii ssp bulgaricus Helveticus Acidophilus Casei/paracasei Rhamnosus Pediococcus	Bactéries corynéformes <i>Brevibacterium linens</i> <i>Arthrobacter nicotinae</i> <i>Corynebacterium flavescens</i> Microcoques <i>Staphylococcus</i> Bifidobacterium Propionibacterium	Kluyveromyces Lactis/marxianus Debaryomyces <i>hansenei</i> Geotrichum <i>candidum</i> Penicillium <i>Candidum</i> <i>Roqueforti</i> <i>nalgiovensis</i>

Penicillium - Les principaux pénicillium utilisés dans les fromages

Journées du 23-24-25 juin 2009



22

7-3-3 Les boissons fermentées

Elles sont fabriquées à partir d'une fermentation alcoolique par les levures qui assurent la production d'éthanol pour la conservation

La fermentation malolactique est également importante pour la désacidification des vins.

Exemple de boisson fermentées : Le cidre, le vin, la bière, le vin

La vinification résulte de la transformation microbienne du moût dont les deux principales :

La fermentation alcoolique : les levures utilisent les sucres du moût et le transforment en éthanol, en glycérol et secondairement en divers acides organiques. Le départ de la fermentation est assuré par *Kloeckera apiculata* puis se succèdent au sein du moût diverses levures du genre *Saccharomyces* (*saccharomyces cerevisiae*). En fin de fermentation dominant *Saccharomyces ellipsoïdes* et *saccharomyces oviformis*.

La fermentation malolactique : conduite par plusieurs bactéries qui transforment l'acide malique en acide lactiques. Les souches isolées diffèrent selon les vins. Dans tous les cas sont présentes des *Lactobacillus* et des *Leuconostoc*.

7-3-4 Les produits carnés

Les produits carnés fermentés sont soit : Coupés en morceaux, en lanière ou hachés (saucisse, salami). Les microorganismes dans les viandes fermentés sont :

- **Les bactéries :**
 - principalement les bactéries lactiques (L'acide Lactique conduit à la conservation de l'aliment),
 - les staphylocoques et les microcoques à coagulase négative sont responsables de la protéolyse et la lipolyse et la production d'arômes. Ils possèdent une catalase très active qui détruit les peroxydes d'hydrogènes, formés par certaines bactéries lactiques, empêchant ainsi le verdissement et le goût de rance du produit
- **Les levures et les moisissures :** Leur développement en surface contribue à : La maturation et le séchage du produit Au développements des arômes et de la couleur Inhibition de la flore indésirable

7- 3-5 Les légumes

Les légumes fermentés sont riches en microorganismes qui sont présents naturellement comme microbiote indigène ou provenant d'une source exogène.

La fermentation des légumes est généralement dominée par des espèces de lactobacillus, Pediococcus, suivie par Leuconostoc, weissella, Tetragenococcus et Lactococcus (Jyoti P. et al 2016)

Exemples de légumes fermentés :

- Les graines de cacao par : *Candida spp., Geotrichum spp, leuconostoc mesenteroides*
- Grains de café par : *Erwinia spp, Saccharomyces*
- Choucroutes par : *Lactobacillus plantarum*
- Sauce de soja : *Rhizopus oligosporus, Rhizopus oryzae*
- Olives : *Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum*
- Cornichons : *Pediococcus cervisiae, Lactobacillus plantarum*

7-2 la flore technologique dans la fabrication des aliments :

7-2-1 Préservation des aliments par les microorganismes :

C'est une méthode de conservation qui utilise des microorganismes ou des substances issues de leur métabolisme pour maîtriser la croissance des flores pathogènes ou d'altération, tout en préservant les qualités organoleptiques et nutritionnelle du produit.

La bio-préservation peut se faire soit par :

- Ajout de substances biologiques antimicrobiennes comme les acides organiques, les enzymes (lactoperoxydase), ou les peptides antimicrobiens (bactériocines).
- Développement de cultures microbiennes dans l'aliment en favorisant la croissance de bactéries lactiques normalement présentes dans l'aliment ou en y introduisant des bactéries protectrices sélectionnées. Ces cultures microbiennes agissent en entrant en compétition, sur le plan nutritionnel, avec la flore pathogène ou par leurs produits de métabolisme (peroxyde d'hydrogène, CO₂, diacétyl, acétaldéhyde, production d'agents antimicrobiens).

7-2-2 Microorganismes aliments ou adjuvant nutritif :

On qualifie de protéines d'origine microbienne ou SCP (single-cell protein) les produits comestibles (alimentation humaine et animale) formés exclusivement par des cellules microbiennes concentrées et séchées.

En plus d'être riches en protéines, ces aliments contiennent un grand nombre d'autres composés nutritifs.

Agaricus bisporus (mycètes) et *Spirulina* (cyanobactérie) sont des exemples de microorganismes aliments.

Les probiotiques sont produits contenant des microorganismes vivants qui ingérées ont un effet bénéfique sur la santé. Le Bifidobacterium est la bactérie la plus utilisée comme probiotique. Les prébiotiques sont des substances qui affectent positivement la croissance et l'activité de quelques bactéries du colon qui agissent sur la santé (lactulose, lactosucrose, lactiol, fructo- oligosaccharides).

Un Symbiotique : est la combinaison entre probiotiques et prébiotiques.

7-2-3 Microorganismes dans l'industrie alimentaires :

En plus d'intervenir directement dans la fabrication de produits alimentaires fermentés, plusieurs micro-organismes sont également utilisés pour la production d'enzymes ou d'autres composés servant d'additifs alimentaires.

- Plusieurs acides aminés, comme la glycine et l'alanine, sont ajoutés à certains produits alimentaires pour améliorer leur saveur. L'acide glutamique est produit à grande échelle par deux bactéries (*Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium flavum*) et sert, sous forme de sel (glutamate monosodique ou GMS), de renforçateur de goût.
- Les acides organiques (acide lactique, propionique, citrique...) sont des additifs très utilisés dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent servir d'agents de conservation, d'acidulants, d'antioxydants, d'émulsifiants, etc. On peut extraire la plupart des acides organiques de cultures microbiennes car certains micro-organismes en synthétisent de grandes quantités au cours de leur métabolisme.
- Plusieurs vitamines sont produites par les micro-organismes. La vitamine B12 peut être obtenue à partir de cultures de *Propionibacterium*

shermanii et de *Pseudomonas denitrificans*.

La riboflavine (B2) est produite par les moisissures *Ashbya gossypii* et *Eremothecium ashbyi*.

- Les enzymes bactériennes (amylases, cellulases, pectinases...) Peuvent être utilisée pour améliorer le goût, la saveur, ou la texture des aliments.

7-2-4 Industrialisation des ferments

La fermentation est soit naturelle et se fait par les microorganismes se trouvant normalement sur l'aliment. Les aliments sont alors à qualité variable et il y a un risque de développement de pathogènes. Soit elle est contrôlée et dans ce cas il y a utilisation de microorganismes sélectionnés qui seront introduit dans l'aliment préalablement pasteurisé ou stérilisé. Dans ce cas l'aliment a une qualité stable et ne présente pas de risque sanitaire.

Les cultures starter ou levains sont des préparations microbiennes concentrées (un ou plusieurs microorganismes), viables se caractérisant par des propriétés physiologiques et métaboliques particulières et capables d'induire des changements désirés dans le substrat.

Les ferments font objet de sélection en vue de les commercialiser. Les Critères de sélection sont ;

- L'accélération des activités métaboliques (acidification, alcool)
- L'amélioration du contrôle du processus de fermentation
- La formation de caractéristiques désirés
- L'amélioration de la sécurité et la réduction des risques hygiéniques et toxicologiques.

Un ensemencement avec des souches commerciales correspond à un taux d'environ 10^6 à 10^7 cellules/ml de milieu. Il se fait soit, directement, par utilisation d des souches lyophilisées ou congelées, ou par une culture mère ce qui permet l'acclimatation et la réduction du temps de latence. La conservation des ferments se fait par Lyophilisation puis conservation à 4°C ou congélation et conservation à -80° C.

8- Les maladies microbiennes d'origine alimentaire :

Nous avons vu que divers microorganismes peuvent se développer sur les denrées alimentaires et causer leur altération ou leur fermentation, de même de nombreux germes pathogènes peuvent s'y développer et nuire à la santé du consommateur.

Plus que 250 maladies d'origines alimentaires ont été décrites. La majorité de ces maladies sont causées par des bactéries, des virus, ou des protozoaires. Toutes ces maladies transmises par les aliments sont liées à une mauvaise hygiène. Elles sont liées à la consommation d'aliments ou d'eau contaminée par des bactéries pathogènes (ou leurs spores cas du botulisme) ou par des toxines produites par des bactéries ou des moisissures toxigènes.

Deux types de maladies d'origine alimentaires sont à distinguer : L'infection alimentaire et l'intoxication alimentaire.

L'infection alimentaire :

Une infection alimentaire implique l'ingestion du pathogène, suivie d'une multiplication dans l'hôte, accompagnée par une invasion tissulaire.

Le pathogène se trouve dans l'aliment et il est vivant lors de l'ingestion. Le nombre de cellules peut être très faible mais elles se multiplient dans le tractus digestif et causent la maladie. Le pathogène peut être un virus (hépatites) ou une bactérie (Salmonellose, Vibriose, Campylobactériose, Yersiniose).

L'intoxication alimentaire :

Elle est liée à l'ingestion de toxines, bactériennes ou de moisissures, qui se sont développées dans l'aliment. La toxine est présente dans l'aliment mais la présence de cellules viables pathogènes n'est pas requise.

Les intoxications les plus répandues sont celles liées à *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, et *Bacillus cereus*.

Parfois il y a combinaison entre infection et intoxication, La maladie est due alors à l'ingestion d'un grand nombre de bactéries pathogènes qui se sont multipliées dans l'aliment contaminé et continuent leur croissance dans le tractus intestinal.

Généralement les bactéries sporulent ou meurent en libérant des toxines qui sont à l'origine des symptômes de la maladie. Les gastroentérites à *Clostridium perfringens* est l'un des exemples les plus rencontrés de toxi-infection.

En plus des bactéries pathogènes associées aux maladies d'origines alimentaire, certaines espèces bactériennes considérées comme non pathogènes peuvent le devenir chez les individus immunodéprimés. Ce sont des pathogènes opportunistes. Exemple : *Aeromonas hydrophila*.

8-1 Le botulisme :

La maladie est causée par *Clostridium botulinum*. Elle est soit due à la toxine préformée dans l'aliment : c'est l'intoxication, soit elle peut être due à l'infection par ingestion du germe ou ses spores qui vont élaborer la toxine dans la lumière intestinale : c'est la toxi-infection.

Caractéristiques : *Clostridium botulinum* est un bacille Gram positif anaérobie obligé, formant des endospores

Habitat : sol et sédiment

Source d'infection : conserves en boîtes, aliments emballés sous vide ou en atmosphère modifiée, les produits fumés et salés

Durée d'incubation : 18 à 24 heures

Symptômes : vision trouble, difficulté de déglutition et de parole, faiblesse musculaire, nausées et vomissements.

Diagnostique : Tests d'agglutination ou par inoculation de souris par le sérum, les selles ou les vomissements des malades.

Les endospores peuvent germer et une exotoxine est produite lors de la croissance végétative. La toxine botulique est une neurotoxine qui se lie aux synapses des neurones moteurs. Elle clive sélectivement une protéine membranaire de la vésicule synaptique : la synaptobrevine. Ceci empêche l'exocytose et la libération d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine. Les muscles ne se contractant pas, il en résulte une paralysie. La mort peut résulter d'une déficience respiratoire.

Huit types de toxines de *C. botulinum* serologiquement distincts sont déterminés (A, B, C1, C2, D, E, F, G), classés uniquement selon les différences antigéniques de leurs neurotoxines. Ce sont des protéines solubles comprenant jusqu'à vingt acides aminés et qui toutes, à l'exception de la toxine C2, ont une action neurotoxique empêchant la libération des neurotransmetteurs à la jonction neuromusculaire. Les types A, B, E et plus rarement F peuvent être la cause d'un décès chez l'homme. Les types C et D sont responsables de maladie chez l'animal.

La toxine botulique A est originellement synthétisée en une chaîne polypeptidique simple (150 KDa) qui est clivée ultérieurement par des protéases bactériennes en un complexe composé d'une chaîne lourde (PM 100 KDa) et d'une chaîne légère (PM 50 KDa). C'est la chaîne lourde qui est responsable de la sélectivité de la liaison avec la terminaison nerveuse et qui, pour traverser la membrane cholinergique, pénètre au niveau présynaptique par un processus d'endocytose. Par la suite, la chaîne légère est libérée dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse où elle inactive les protéines impliquées dans le mécanisme d'exocytose des vésicules d'acétylcholine (figure 7).

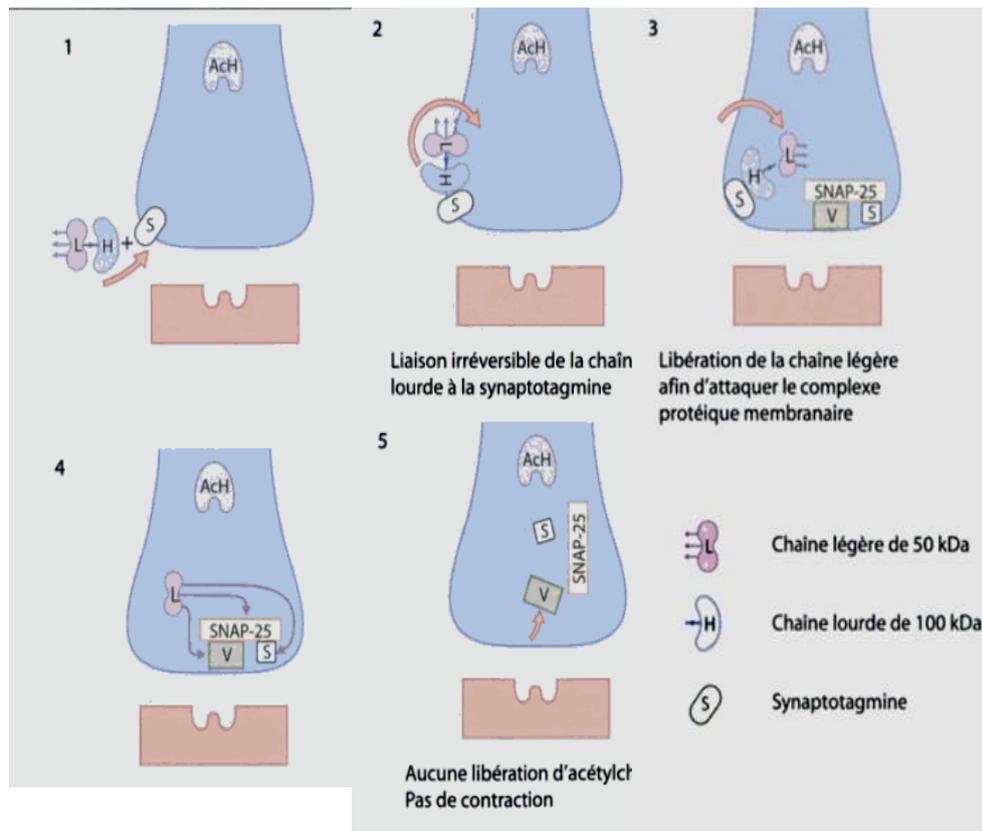


Figure7 :action de la toxine botulinique au niveau de la jonction neuromusculaire.1-la chaîne lourde de la toxine botulinique se lie à la synaptotagmine située sur la membrane présynaptique .2-le complexe chaîne lourde /synaptotagmine permet à la chaîne légère de la toxine botulinique de pénétrer dans la cellule.3- La chaîne légère attaque le complexe membranaire et le désactive empêchant la liaison de l'acétylcholine.4-La toxine botulinique attaque la protéine SNAP-2S du complexe protéique membranaire tandis que la toxine botulinique B s'attaque à la protéine VAMP(synaptobrévine).5-Il n'y a pas de libération d'acétylcholine.

8-2 La gastroentérite à *Campylobacter jejuni* :

C. jejuni est la première cause de pathologie entérique d'origine bactérienne dans les pays industrialisés.

Caractéristiques : bacille courbé, GRAM négatif, forme spiralée, mobile avec un ou deux flagelles, présence de capsule, micro- aérophiles.

Habitat : tube digestif d'animaux, eaux de surface

Source d'infection : lait viande de volaille, eau, contact avec les animaux infectés

Durée d'incubation :2 à 5 jours

Symptômes : diarrhée, fièvre élevée, inflammation importante de l'intestin, selles sanguinolentes

Diagnostique : culture dans une atmosphère réduite en oxygène et riche en CO₂ sur gélose au sang.

C'est une bactérie qui adhère aux cellules intestinales puis envahit l'intestin grêle et secrète une toxine qui distend le cytosquelette (CDT).

8-3 Le choléra :

Le choléra est dû à une bactérie de la famille des Vibrionaceae : *Vibrio cholerae*

Caractéristiques : bacille Gram négatif, incurvé, et mobile par un flagelle polaire. Seul les sérotypes O1 et 139 sont pathogènes

Habitat : aquatique

Source d'infection : ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par de matières fécales de patients ou de porteurs.

Durée d'incubation : 24 à 72 heures.

Symptômes : déperdition massive de liquides et d'électrolytes associés à des crampes musculaires abdominales, des vomissements de la fièvre et des diarrhées liquides.

Diagnostic : culture à partir de selles puis agglutination par des antisérums spécifiques

Les bactéries adhèrent aux muqueuses de l'intestin grêle et secrètent la toxine cholérique. C'est une protéine composée de deux sous unités fonctionnelles : une sous unité A enzymatique et une sous unité B se fixant au récepteur intestinal (GM1). La sous unité A pénètre dans les cellules épithéliales de l'intestin et active l'adénylate cyclase, par addition d'un groupe ADP-ribosyle (immobilisant la protéine G sous sa forme liée). En conséquence, il y a stimulation continue de la synthèse de l'AMPc, ce qui modifie l'activité des canaux anioniques en particulier la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) entraînant alors une hypersécrétion d'eau et de chlorures et inhibition de l'absorption d'ions sodium.

Le gène de la toxine cholérique est porté par le bactériophage CTX. Le phage se fixe aux pilis bactériens et entre ensuite dans la bactérie et s'intègre à son chromosome.

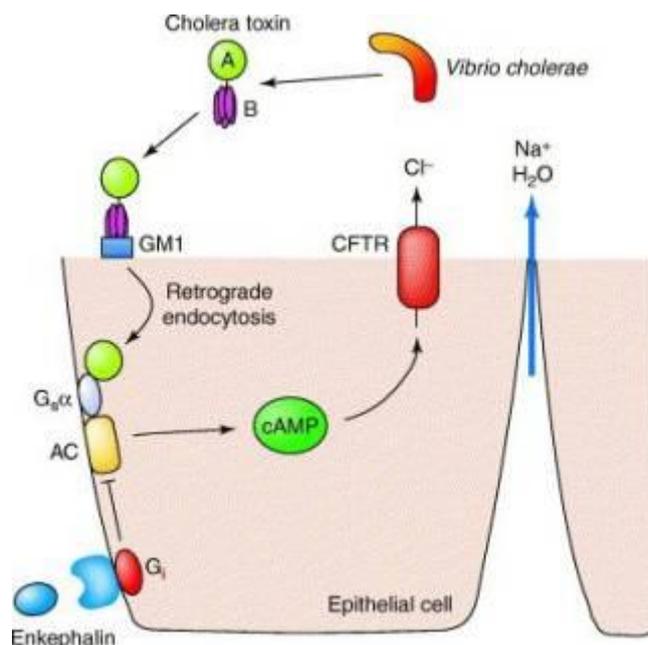


Figure 8 :Action de la toxine cholérique. A, B (sous unités de la toxine); GM1 (récepteur ganglioside GM1); Gs (protéine G); AC (adenylate cyclase); Gi (protéine); cAMP (AMP cyclique); CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Reprinted from Trends Pharmacol Sci. 26, J. R. Thiagarajah and A. S. Verkman, New Drug Targets for Cholera Toxin, PP. 172-5, 2005.

8-4 La listériose :

L'agent causal de la listériose est *Listeria monocytogenes*

Caractéristiques : Bacille de 12µm ,GRAM positif, mobiles à 20 °C(ciliature péritriche, catalase positives, non sporulées, et anaérobies facultatifs ,hémolytiques, catalase positif, se regroupe en chainettes ou en palissade.

Habitat : sol, végétaux, de nombreux réservoirs animaux.

Source d'infection : Lait , fromages tendres ,légumes et viandes contaminés.

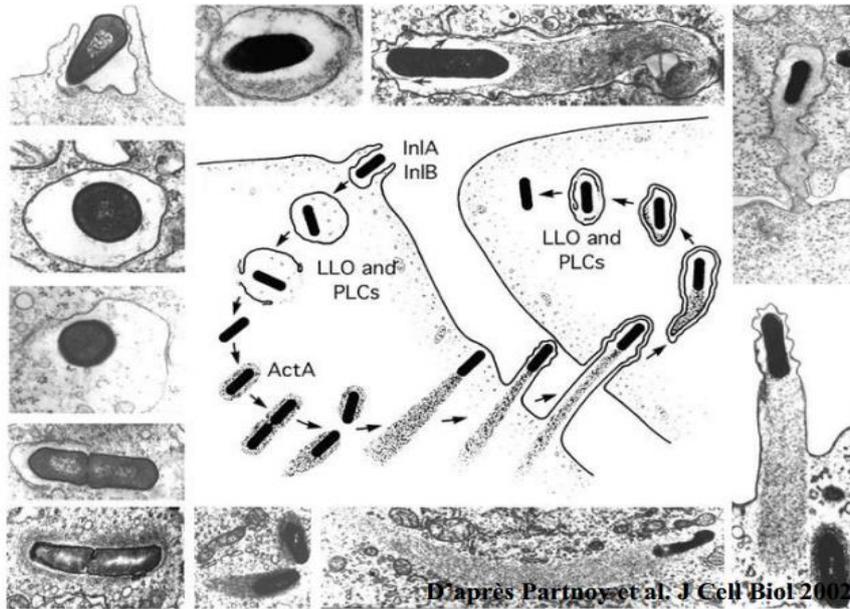
Durée d'incubation : extrêmement variable de 3 à 70 jours.

Symptômes : septicémie, méningite (ou méningo-encéphalite), encéphalite, et des infections intra-utérines ou cervicales chez la femme enceinte, ce qui peut entraîner un avortement spontané (au cours des second et troisième trimestres).

Diagnostique : culture

L.monocytogenes fait partie de la flore intestinale de l'individu sain, mais Chez les immunodéprimés elle cause des syndromes invasifs .L'invasion, la multiplication intracellulaire, le passage de cellule en cellule se font par l'intermédiaire de protéines comme la phospholipase C, l'Internaline, et la listériolysine O(hémolysine). *Listéria* utilise aussi les filaments d'actine pour se déplacer à l'intérieur et entre les cellules (figure 9).

Sa capacité remarquable de multiplication à basse température (psychrotrophe) pose de délicats problèmes pour les produits réfrigérés contaminés. De plus elles résistent assez bien au chauffage : 30 minutes à 55°C. La pasteurisation les détruit toute fois.



InlA, InlB : Internalines A, B ; LLO : Listériolysine O ; PLCs : Phospholipases C ;
ActA → polymérisation de l'actine

Figure9 : Cycle de vie et facteurs de virulence de Listeria monocytogenes.

8-5 La salmonellose :

La salmonellose est causée par plus de 2000 sérovars de salmonella. Le plus fréquent dans les infections humaines est le sérovar *S. typhimurium*

Caractéristiques : bacille GRAM négatif, mobile, non sporulant, aéro-anérobie facultatif chimioorganotrophes.

Habitat : Tube digestif des oiseaux et d'autres animaux.

Source d'infection : Produits bovins contaminés, volaille, œufs, produits avec œufs et eau.

Durée d'incubation : 8 à 48 heures

Symptômes : douleurs abdominales, crampes, diarrhées et fièvres (2 à 5 jours)

Diagnostique : isolement de la bactérie d'aliments et des selles des patients.

Salmonella envahit la muqueuse intestinale où elle produit une entérotoxine et une cytotoxine qui détruisent les cellules épithéliales.

8-6 La fièvre typhoïde :

La fièvre typhoïde est causée par plusieurs sérovars virulents de salmonella typhi

Caractéristiques :

bacilles à Gram négatifs, mobiles (ciliature péritriche), aéro-anaérobies facultatifs, oxydase -

Habitat : dans les milieux aquatiques pollués, la contamination par les excréments d'animaux porteurs étant très importante. Les vertébrés aquatiques, notamment les oiseaux (Anatidés) et les reptiles (Chéloniens) sont d'importants vecteurs de salmonelles. Les volailles, les bovins et les ovins étant des animaux fréquemment contaminants.

Source d'infection : eau et aliments contaminés par des selles d'humains ou d'animaux infectés

Durée d'incubation : 10 à 14 jours

Symptômes : fièvre, céphalées, douleurs abdominales de l'anorexie et malaise plusieurs semaines

Diagnostique : mise en évidence du bacille dans le sang, les selles ou l'urine et de la sérologie (test widal)

Les bactéries colonisent l'intestin grêle, pénètrent dans l'épithélium et se répandent dans les tissus lymphoïdes, le sang, le foie et la vésicule biliaire. La libération d'endotoxine joue un rôle important dans la pathogénie de la maladie. La lyse des bactéries au niveau des ganglions libère le lipopolysaccharide toxique LPS ou endotoxine O (lié à l'Ag O). C'est un complexe glucido-lipido-polypeptidique. L'endotoxine O est charriée dans le sang, provoque localement les ulcérations des plaques de Peyer ; véhiculée jusqu'aux ventricules cérébraux elle détermine le typhus cet état de torpeur, de prostration, de troubles nerveux ou d'abattement, des diarrhées accompagnées de douleurs abdominales ; c'est aussi l'endotoxine qui, agissant au niveau du centre thermorégulateur, engendre la fièvre à 40°C. Cette endotoxine est thermostable (résistant à la chaleur 100°C et alcool stable et détruit par le formol à 0.5 %).

8-7 La shigellose :

La shigellose ou dysenterie est une diarrhée due à quatre espèces du genre shigella : *Shigella boydi i*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*. La dose infectieuse est de 10 à 100 bactéries.

Caractéristiques : bacilles GRAM négatif, immobile, non sporulé

Habitat : tube digestif de l'homme

Source d'infection : aliments souillés, bucco fécale

Durée d'incubation : 1 à 3 jours

Symptômes : selles liquides contenant du sang, du mucus et du pus, ulcération du colon

Diagnostique : isolement et détermination des caractères biochimiques et sérologiques.

Ce sont des parasites intracellulaires facultatifs qui colonisent les cellules épithéliales du colon. La bactérie induit sa propre phagocytose par les cellules mucosales puis détruit les membranes du phagosome. Après multiplication intra cytoplasmique, les Shigelles envahissent les cellules voisines. Elles produisent des endo- et des exotoxines.

8-8 La diarrhée du voyageur et les infections à *Escherichia coli* :

Un grand nombre de voyageurs sont atteints de diarrhées qui résultent de la rencontre avec certains virus, protozoaires ou bactéries normalement absent de leur environnement. Un des agents majeurs impliqué est *Escherichia coli*. *Escherichia coli* est un pathogène alimentaire important. Des types entéropathogènes, entéro-invasifs et entérotoxinogènes peuvent provoquer de diarrhées.

Caractéristiques : Bacille Gram négatif, oxydase négatif, aéroanaérobie facultatif

Habitat : Sol, flore intestinale,

Source d'infection : produits carnés (viande hachée, hamburgers et salamis), fruits et légumes, eau contaminée.

Durée d'incubation : 1 à 15 jours

Symptômes : Crampes abdominales, diarrhée

Diagnostique : microbiologique et sérologique.

E coli peut donner une diarrhée par plusieurs mécanismes et on reconnaît actuellement 6 pathovars :

Les *E. coli* entérotoxinogènes : ECET responsables de diarrhées infantiles dans les pays chauds à hygiène déficiente et de la diarrhée des voyageurs (touristes). Leur pouvoir pathogène est lié à la production de 2 toxines : une toxine thermolabile (proche de celle du vibron cholérique) une toxine thermorésistante.

Les *E. coli* entéroinvasives : ECEI, ils sont proches des shigelles. Ils envahissent les cellules épithéliales du gros intestin et peuvent créer des ulcérations. Ils sécrètent une toxine (shigella like)

Les *E. coli* entéropathogènes : ECEP Ils sont responsables de gastro-entérites infantiles. Ils appartiennent à des sérotypes sérologiques particuliers (O111, H2,) Ils

secrètent une toxine voisine de la toxine des shigelles (*Shigella like*) Actuellement, ils ont pratiquement disparu des pays industrialisés .

Les E.coli entérohémorragiques : ECEH produisent une diarrhée hémorragique pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique. Non invasifs, ils produisent de puissantes cytotoxines. Le syndrome hémolytique et urémique se caractérise par l'apparition brutale d'une thrombopénie, d'une hémolyse, d'une insuffisance rénale aiguë avec anurie. Il survient plutôt chez l'enfant et la femme enceinte ou en post-partum. le sérotype le plus fréquent est O157 H7.

E.coli entéroaggrégatives : ECEAgg sont actuellement définies comme des souches qui ne sécrètent pas les entérotoxines LT ou ST, et qui adhèrent aux cellules de culture en formant des agrégats.

E.coli adhérents diffusés : ECDA différenciées par leur phénotype d'adhésion n'impliquant pas d'agrégats microbiens et formant des lésions diffuses sur les cellules Hep-2. Les ECDA sont essentiellement responsables de pathologies extra-intestinales (infections urinaires : cystites, pyélonéphrites).

8-9 L'intoxication alimentaire staphylococcique :

C'est une toxi-infection causée par *Staphylococcus aureus*

Caractéristiques : Cocci Gram positif, aéroanaérobie facultatif, catalase positive, asporulé

Habitat : eau, eau usée, air, surfaces cutanées de l'homme et des animaux

Source d'infection : viandes salades à base de viandes

Durée d'incubation : 2 à 4 heures

Symptômes : vomissement, diarrhées, crampes abdominales et parfois céphalées

Diagnostique : culture

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* est dû à la production par certaines souches d'entérotoxines. On distingue 7 types de toxines staphylococciques : A, B, C1, C2, C3, D et E. Les toxines A et B sont les plus fréquemment impliqués dans les intoxications alimentaires. Ces entérotoxines sont stables dans une large gamme de pH (2 à 11) elles résistent aux enzymes protéolytiques et à la chaleur. L'intoxication staphylococcique nécessite une quantité élevée d'entérotoxines (charge en staphylocoque de 10^5 à 10^6 germes/g de l'aliment).

8-10 Entérite à *Clostridium perfringens* :

Caractéristiques : bacille Gram positif. La bactérie est immobile, sporulée et anaérobie. Croissance entre 10 et 52 °C. (Optimum 43 °C: T=13 min.) Une ingestion massive de bactéries avec leur toxine est nécessaire à la TIAC (106/g), il s'agit donc d'une toxi-infection typique

Habitat : le sol, la poussière, les eaux d'égout et les intestins des animaux et des humains.

Source d'infection : aliments à forte teneur en amidon ou en protéines, comme les haricots cuits, les produits de viande, les potages liés et les sauces.

Symptômes : diarrhée, douloureuse et très forte est peu dangereuse. Elle commence environ 12h après le repas contaminé et guérit aussi en 12h environ.

Cette bactérie va produire des nécro toxines, provoquant ainsi l'entérite nécrosante. La toxine majeure la plus fréquente est la toxine alpha, essentiellement produite par *Clostridium perfringens* type A. Cette toxine est impliquée dans de très nombreux cas de gangrène chez l'homme et les animaux.

8-11 Bacillus cereus :

L'intoxication alimentaire à *Bacillus cereus* revêt deux formes : la forme émétique, accompagnée de nausées et de vomissements (durée d'incubation : 1 à 5 heures) et la forme diarrhéique, accompagnée de douleurs abdominales et d'une diarrhée (durée d'incubation : 6 à 24 heures).

Caractéristiques : bacille en bâtonnet de 1 à 5 microns, Gram positif, capable de sporuler ; la multiplication et la germination sont optimales à 30°C ; produit deux types de toxines thermolabile et thermostable.

Habitat : il est présent partout (sol, végétaux, hommes)

Source d'infection : absorption d'un aliment contaminé par le bacille notamment les préparations à base de riz, la semoule, germes de céréales, les pâtes cuites, légumes cuits. la dose infectieuse est de 1 million

Symptômes : liés aux exotoxines ; vomissements de 1 à 5 heures après l'absorption de l'aliment, rémission en 6 à 24 heures ; ou diarrhée de 10 à 12 heures après l'absorption, rémission en 12 à 24 heures.

8-12 La mycotoxicose :

Les moisissures peuvent se développer sur les aliments et sécréter des toxines qui peuvent provoquer des intoxications alimentaires.

L'ergotisme est une intoxication due à l'infection des grains de céréales par l'ascomycète *Claviceps purpurea*. Ce microorganisme produit des alcaloïdes hallucinogènes qui engendrent des troubles du comportement, un avortement et la mort en cas d'ingestion d'aliments contaminés.

Les mycotoxines peuvent être contenues dans les spores, le thalle, ou excrétées dans l'aliment sur lequel la moisissure s'est développée.

On distingue les mycotoxicooses aiguës provoquées par l'ingestion en une seule fois ou plusieurs fois rapprochées d'une dose importante de la mycotoxine et les mycotoxicooses chroniques consécutives à l'ingestion répétée de faibles doses de la mycotoxine.

Il existe plusieurs mycotoxines :

Les aflatoxines : produites par *Aspergillus flavus* dans les grains de céréales. Ces composés cycliques (figure 10) plans s'intercalent dans les acides nucléiques cellulaires et agissent comme des substances mutagènes décalant le cadre de lecture et cancérogènes. Leur conversion en dérivés instables se fait principalement dans le foie.

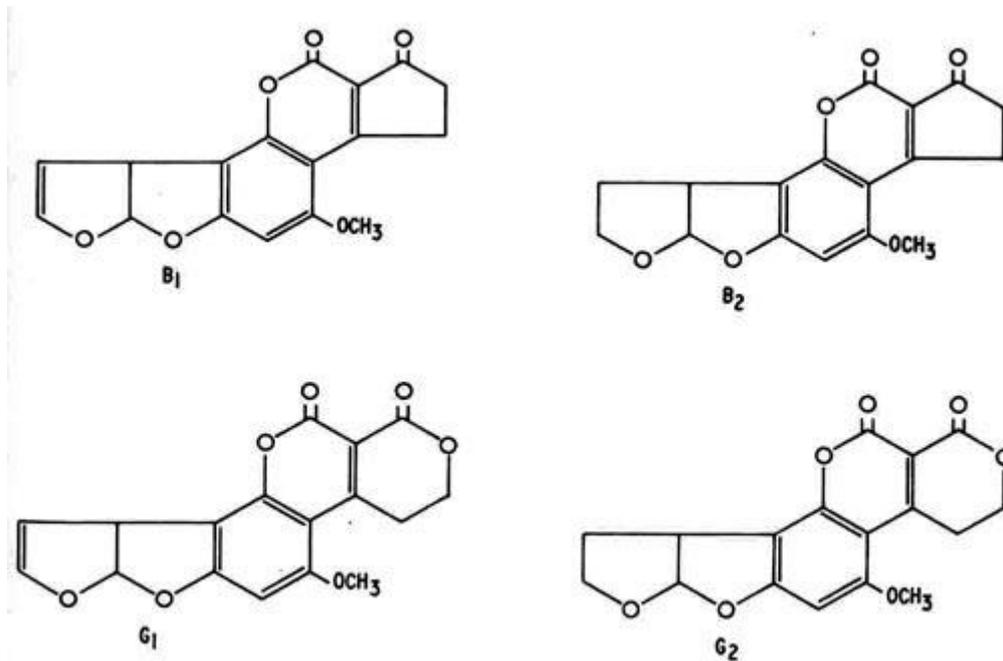


Figure 10 : les aflatoxines ont quatre structures de base B1, B2 (fluorescentes en bleu), G1, et G2 (fluorescentes en vert)

Les fumonisines : produites par *Fusarium moniliforme*, contaminent le maïs et les produits dérivés et donnent la leucoencéphalopathie chez le cheval, l'œdème pulmonaire chez le porc et le cancer de l'œsophage chez l'homme. Elles agissent en stoppant la synthèse et le métabolisme des sphingolipides.

La palutine : produite par *Penicillium expansum* et *Aspergillus clavatus*. Elle a des effets immunotoxiques et neurologiques chez les animaux.

La citrinine : produite par *Penicillium citrinum* se développe sur le riz et l'orge moisis. Elle cause des désordres rénaux.

Les ochratoxines : produites par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium veridicatum*. Il a été démontré expérimentalement chez l'animal qu'elles agissent par inhibition de la synthèse protéique par compétition avec la phénylalanine, par mobilisation du calcium intracellulaire, inhibition de la respiration mitochondriale ; inhibition de la

synthèse d'ATP..Elles sont néphrotoxiques hépatotoxiques, tératogènes, immunosupresseurs et cancérigènes.

Les mycotoxines sont relativement thermostables, la congélation ne permet pas leur inactivation. Seule l'irradiation ionisante est efficace bien qu'elle n'élimine pas la totalité des toxines.

Notons que certains microorganismes eucaryotes marins peuvent synthétiser des toxines puissantes tels que les phycotoxines produites par les algues qui peuvent contaminer le poisson et les coquillages.

8-14 Intoxication par Les amines biogènes :

Ce sont des amines non volatiles provenant de la dégradation microbienne des aliments riches en protéines, suite à la décarboxylation d'acides aminés (figure 11) par une décarboxylase microbienne (*Proteus morganii*, *E.coli*, *Lactobacillus bulgaricus*).

Les amines biogènes sont normalement présentes dans les aliments à faible dose. Mais leur production excessive par l'activité microbienne provoque des intoxications.

Les principales amines biogènes sont : l'histamine, la tryamine, la putrescine, la cadavrine, la spermidine et la spermine.

L'histamine est l'amine la plus étudiée. Les symptômes d'une intoxication histaminique sont cutanés (rougeurs, œdème, urticaire) ; des céphalées, des tachycardies, des vomissements et des diarrhées peuvent être observés.

Les microorganismes qui produisent de grandes quantités d'histamines dans le thon sont : *Proteus morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes*

Les aliments les plus incriminés sont les produits de pêche (sardines, thon, maquereau) et certains fromages.

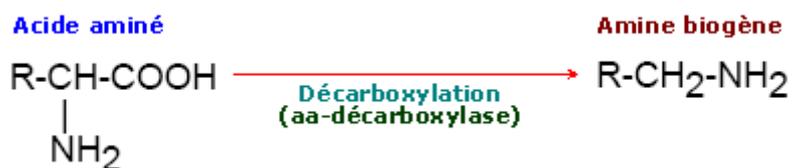


Figure 11: Dégradation enzymatique des protéines en amines biogènes

La production d'aminos biogènes se fait d'une façon optimale entre 20 et 30°C et elles ne sont pas produites au-delà de 40°C et au-dessous de 0°C.

8-15 Infections virales :

Les infections virales d'origine alimentaire peuvent être dues aux virus ou aux bactériophages. Les virus s'attaquent aux cellules intestinales et peuvent passer à d'autres organes comme le foie.

Les infections virales les plus connues sont : Les gastro-entérites virales aiguës : les rotavirus, les virus de Norwalk, d'autres calcivirus et des astrovirus, l'hépatite A, l'hépatite et la poliomyélite.

La cause principale dans l'infection virale est la contamination de l'eau par les égouts et la consommation de mollusques bivalves (moules huîtres ...) contaminés

Les bactériophages s'attaquent à la flore commensale et provoquent des désordres plus ou moins importants.

L'hépatite A :

Le virus de l'hépatite A (HAV) est un hépatovirus appartenant à la famille des Picornaviridae. C'est un virus icosaédrique sans enveloppe, contient de l'ARN simple brin linéaire positif

L'infection se fait par contamination fécale-orale de la nourriture. La période d'incubation est de 15 à 50 jours. La maladie ne donne que des symptômes intestinaux bénins mais parfois il y a virémie et le virus se multiplie dans le foie les symptômes sont alors une anorexie, un malaise général, de la fièvre et des frissons, lorsque le foie est infecté il s'ensuit une jaunisse. La mise en évidence se fait par la détection d'anticorps contre HAV.

Le contrôle de l'infection dépend des mesures hygiéniques simples et par un vaccin anti HAV

La poliomyélite :

Causée par le poliovirus un membre de la famille des Picornaviridae.

C'est un virus à ARN simple brin avec 3 sérotypes différents 1, 2 et 3. Le virus est très stable et peut rester infectieux pour des périodes assez longues dans les aliments et l'eau. Une fois ingéré le virus se multiplie dans les muqueuses de la gorge et de l'intestin grêle. De ces sites il envahit les amygdales et les ganglions lymphatiques du cou et de la partie terminale de l'intestin grêle. Il n'y a pas de symptômes ou une courte maladie caractérisée par des maux de la gorge, des céphalées, des vomissements et une perte de l'appétit. Le virus parfois peut causer une virémie. Dans un pourcentage des cas la virémie aboutit à la pénétration du virus dans le système nerveux central et cause une paralysie motrice et musculaire.

Les vaccins (virus atténués ou inactivés) contre la maladie ont diminué l'incidence de la polio.

Les gastroentérites virales :

Causés par le genre Norovirus (virus Norwalk (NLV)) et de virus similaires ; Le NLV est un virus à ARN simple brin classé dans la famille des Calciviridae. Il peut survivre à des taux élevés de chlore et à une large gamme de température (0 à

60°C). La maladie survient après ingestion d'aliments ou d'eau contaminée, après une période d'incubation de 12 à 48 heures. Les symptômes sont la nausée, les vomissements, les crampes abdominales et la diarrhée. La dose infectieuse est de l'ordre de 100 particules virales.

Le diagnostic de la maladie se fait par test ELISA, hybridation d'acides nucléiques ou par TR-PCR.

8-16 Infections parasitaire :

Certains protozoaires sont responsables d'infections chez l'homme suite à la consommation d'eau ou de végétaux crus contaminés par les eaux d'irrigations. Les protozoaires les plus connus sont :

- *Entamoeba histolytica* qui cause une dysenterie amibienne sévère qui peut devenir fatale si le parasite envahit les tissus d'organes comme le foie, le poumon ou le cerveau.

- *Giardia lamblia* et *Dientamoeba fragilis* qui donnent surtout des gastroentérites

- *Toxoplasma gondii* : agent de la toxoplasmose, la maladie est souvent asymptomatique ; sa gravité est liée aux atteintes fœtales lorsqu'elle survient en cours de grossesse (souffrance neurologique, syndrome infectieux avec ictère, syndrome hémorragique ; hydrocéphalie, retard psychomoteur, convulsions, chorio-rétinite..)

8-17 Maladies à prion :

Le prion est à l'origine de l'encéphalopathie spongiforme des bovins (ESB ou vache folle) on l'associe à la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme. La consommation de produits d'origine bovine contenant des tissus du système nerveux central est la voie la plus probable de transmission des prions à l'homme.

Le prion est un agent pathogène de nature protéique (**PR**oteinaceous **IN**fectious **ON**ly particle) ne possédant pas d'ADN ou d'ARN. En fait le prion existe sous deux formes : une forme normale Pr^{pc} qui existe normalement dans les cellules et une forme pathogène Pr^{psc}.

La forme pathogène résulte de la modification de la conformation tridimensionnelle de la Pr^{pc}. Elle résiste à l'action des protéases et à un chauffage sec de 600°C pour 15 min.

Règles pour maîtriser les risques des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC).

Les TIAC sont définies comme suit : Survenue d'au moins 2 cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Les démarches fondamentales pour maîtriser les risques liés aux TIAC sont :

Aliment : contrôle et inspection des matières premières (température, microorganismes, composition etc.). Lavage des légumes ou végétaux à consommer crus.

Propreté : nettoyage et désinfection rigoureux, ateliers ou cuisines ordonnés, concept des locaux, surfaces etc., poubelles fermées etc.

Personnel : éducation des règles d'hygiène, lavage des mains, bonnets - gants etc.

Eau : contrôle et maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau.

Réfrigération : refroidissement rapide et immédiat des produits cuits à consommation différée : vitesse de refroidissement, au moins, de 80 à 10 °C en 2 heures

Température : pour les aliments cuits, refroidis et à consommer chauds, la zone tiède (20 - 45°C) est à éviter, il faut un refroidissement rapide qui fait passer la préparation de + 65° C à + 10° C en moins de deux heures. La denrée est ensuite entreposée et transportée à + 3° C. La denrée, avant d'être servie, est remise à la température de + 65° C, à cœur, en moins d'une heure et servie immédiatement.

La décongélation doit se faire à 4°C pour les denrées animales, ne pas dépasser 6°C. Eliminer les exsudats. La décongélation doit être complète avant cuisson. Ne pas recongeler. Utiliser des systèmes rapides (microondes)

Organisation : interdire tout croisement entre le circuit sain et le circuit souillé, protéger systématiquement les aliments (conditionnement précoce etc.)

Préparation : éviter des préparations de trop grandes quantités.

Assainissement : barèmes de pasteurisation, stérilisation, cuisson adaptée. Utiliser du matériel performant et réaliser des contrôles de l'efficacité de l'opération.

Les procédures HACCP :

Hazard analysis and critical control points, HACCP a été traduit en français par Hygiène Alimentaire et Contrôle des Points Critiques. L'intérêt des HACCP est de mettre à disposition de l'industrie agro-alimentaire, des professionnels de la restauration, mais aussi des producteurs de denrées alimentaires (paysans, ostréiculteurs, etc.) des procédures qui, si elles sont appliquées rigoureusement, facilitent la prévention des risques de contamination microbienne des aliments. Ces procédures sont le plus souvent écrites pour qu'à tous les points de la chaîne de fabrication d'un aliment, chaque acteur puisse contrôler les points critiques, c'est-à-dire les étapes dont on sait ou présume qu'elles sont à risque. Elles offrent, en outre, une bonne traçabilité tout au long de la chaîne de fabrication.

9 -Mécanismes de la pathogénèse des bactéries pathogènes alimentaires

Pour comprendre les mécanismes de pathogénicité des bactéries il est nécessaire d'identifier les déterminants spécifiques (ou facteurs de virulence) intervenant au cours des différentes étapes de l'infection à savoir :

- La colonisation des épithéliums.
- Invasion des épithéliums et des muqueuses.
- Dissémination dans d'autres cellules.
- Production d'effets toxiques sur les cellules et les tissue de l'hôte.

Définition d'un pathogène

Un pathogène est un microorganisme dont la survie dépend de sa capacité à se multiplier et persister sur/ ou dans d'autres espèces par rupture et désorganisation actives des barrières cellulaires ou humorales qui normalement limitent ou inhibent les autres microorganismes.

Cette capacité à s'établir dans une niche spécifique demande l'expression de facteurs de virulence permettant aux pathogènes de s'établir dans l'hôte et de se transmettre à de nouveaux hôtes.

Selon les facteurs de virulence exprimés, 3 groupes de bactéries :

1. Les bactéries qui restent exclusivement localisées à la surface des muqueuses avec synthèse d'exotoxines.
2. Les bactéries capables d'envahir la muqueuse.
3. Les bactéries qui traversent la muqueuse et atteignent la circulation sanguine et lymphatique avec dissémination dans tout l'organisme.

9-1 Colonisation

Pour coloniser les muqueuses un pathogène doit vaincre):

- La compétition des bactéries résidentes.
- Les barrières physiques opposées par l'hôte comme la couche de mucus, le flux intestinal, le péristaltisme et les jonctions serrées
- Les barrières chimiques comme l'acidité, la présence de bile, Les défensines
- La barrière humorale dont les Ig A (figure12).

Plusieurs facteurs de colonisation ont été découverts chez les entéro-pathogènes.

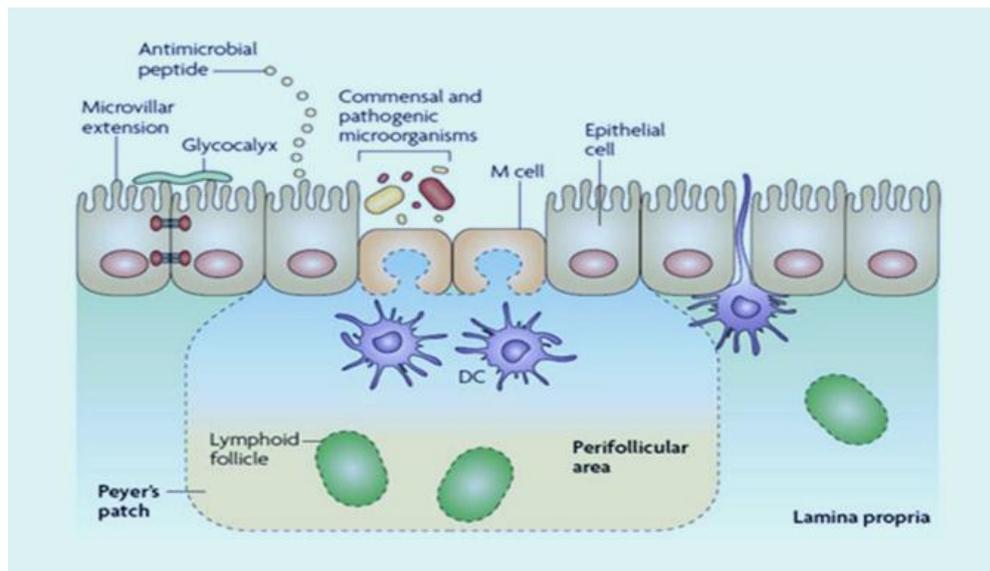


Figure 12 : Composantes de la barrière gastro-intestinale impliquées dans l'immunité intestinale.

9-2 L'adhésion

C'est la 1^{ère} étape de l'infection. Elle permet la colonisation de l'hôte.

L'adhérence ou attachement se fait par interaction entre :

- un récepteur sur la cellule eucaryote ou soluble.
- un ligand bactérien = adhésine de surface

L'adhésion ne permet pas uniquement l'attachement aux cellules de l'hôte mais aussi permet de déclencher une série de signalisation qui affecte l'invasion bactérienne et/ou les réponses anti ou pro- inflammatoires en affectant les récepteurs de l'immunité innée.

Par fois l'attachement est suffisant pour déclencher la maladie Exemple : les *E. coli* entéro-pathogènes (ECEP).

L'adhésion aux cellules de l'hôte peut se faire soit par : des adhésines fibrillaires ou non fibrillaires, par les polysaccharides extracellulaires, la capsule, les flagelles, et le LPS

Un pathogène peut exprimer et utiliser plusieurs types d'adhésines.

Trois types d'interactions adhésines- récepteurs sont connus actuellement :

- Adhésine protéique (lectine)et récepteur glucidique
- Adhésine protéique et récepteur protéique
- Adhésine hydrophobe et récepteur hydrophobe.

3-2-1 Les adhésines protéiques

Structures protéiques de plusieurs types : Les fimbriae ou (encore pili), Les adhésines afimbriaires et les protéines de la membrane externe ou OMP (outer membrane proteine) : internalines ,invasines et intimines .

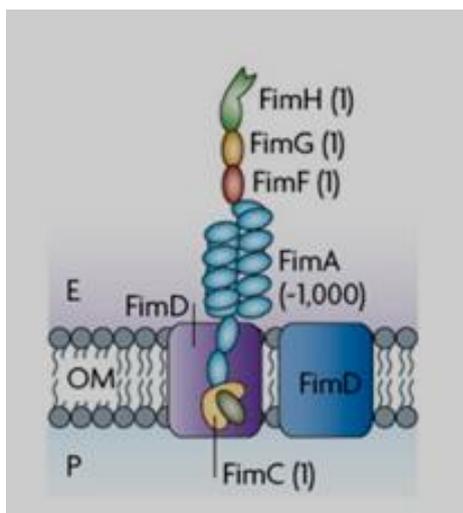
Les fimbriae ou pilis

Appendice filamenteux (fibrille) 10 à 100 nm de long, Constitué par la polymérisation d'une sous unité peptidique majeure(piline) formant un cylindre hélicoïdal et assemblé à des sous unités protéiques mineures (protéines de fixation d'ancrage) dont l'adhésine proprement dite située en position apicales(Figure 3).

Une douzaine de fimbriae ont été identifiées, leur fonction, leur structure leur localisation à la surface bactérienne et leur mécanisme de sécrétion est variable. Elles sont hémagglutinantes(hémagglutinines)

Certaines adhésines agissent spécifiquement avec certaines molécules des cellules hôtes, ceci explique la spécificité et le tropisme tissulaire de certaines bactéries.

Elles sont immunogènes et peuvent présenter des variations d'expression (échappement aux défenses de l'hôte)



Adhésine filamenteuse de 7nm de diamètre et 1µm de long, composée de :

FimA SU protéique majeure

FimH mannose spécifique

FimG et Fim F lient FimA à FimH

Les protéines trans-membranaires FimD et la protéine chaperonne

Figure13 : Représentation schématique du pili type 1.

Les curli :

Ce sont de fins appendices filamenteux formée par une seule SU : la curline. Ils Permettent l'attachement des entérobactéries aux surfaces (*E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Enterobacter*).

C'est un facteur de virulence important chez les *E.coli* O157: H7 .

Les adhésines non fibrillaire

Les afimbriae ne forment pas de structures polymériques longues ce sont des protéines monomériques ou oligomériques et permettent une adhésion plus intime avec l'hôte.

Chez *E.coli* on A : Afa, Nfa , M(agglutine le groupe sanguin M)

L'intimine

L'intimine, protéine de la membrane externe, provoque l'attachement de *E. coli* aux cellules épithéliales. C'est un produit d'un gène chromosomique *eaeA* (*eae* = *E.Coli* attaching effacing), dont la présence est un facteur important de virulence de EPEC et EHEC. La phosphorylation des tyrosines des protéines de la cellule hôte sous l'effet de l'intimine provoque la réorganisation du cytosquelette.

9-2-2 Les adhésines polysaccharidiques

Ce sont des composants des membranes bactériennes, de la paroi, ou de la capsule

Exemple :

Les acides théchoïques des enveloppes des GRAM+ (*Staphylococcus spp*).

Les glucannes et les mananes de la capsule (*Mycobacterium spp*).

Le lipopolysaccharide

Le LPS est situé à la face externe de la membrane des bactéries Gram négatif.

Il est constitué de trois parties :

- **le lipide A** : partie hydrophobe, inséré dans la bicouche phospholipidique membranaire (endotoxine)
- **core** : noyau oligosaccharidique et
- **antigène-O** : un polysaccharide caractéristique de la bactérie (sérotypage)

Rôle : échapper à la phagocytose, l'adhésion aux cellules et la toxicité des bactéries (endotoxine).

9-2- 3 Les récepteurs

Présents sur les cellules ou matrice extra cellulaire ce sont :

- des Carbohydate, des glycoprotéines ou des glycolipides.
- protéines de la membrane cytoplasmique (récepteurs à hormones).
- Protéines de la matrice extra cellulaire : fibrinogène, fibrinoctine, élastine, collagène.

Dans certains cas le pathogène injecte son propre récepteur dans la cellule hôte (TIR pour EPEC) par le système de sécrétion type III, une fois inséré à la membrane cytoplasmique de l'hôte, il adhère à un adhésine du pathogène(l'intimine).

(TIR= translocated intimine receptor)

L'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte est hautement spécifique ce qui explique :

- La spécificité de l'hôte et
- Le tropisme tissulaire.

9-3 Invasion :

L'invasion de l'épithélium est une caractéristique bien connue des bactéries du genre *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* et *Listeria*.

Ces bactéries sont capables d'induire leur propre capture par les cellules de l'hôte.

La sécrétion des produits bactériens par le système de sécrétion de type III induit l'activation des protéines telles que Rho ou Cdc42 de la cellule hôte .Ces protéines jouent un rôle important dans le remaniement du cytosquelette .leur activation induirait le comportement phagocytaire de la cellule eucaryote.

9-3-1 Mécanismes d'internalisation chez les bactéries invasives :

Deux mécanismes :

- **types trigger** : utilisation du système de sécrétion type III pour injecter dans la cellule hôte de protéines effectrices qui agisse sur le cytosquelette conduisant à la formation de longues projections membranaires qui vont entourer la bactérie et conduire à son internalisation (figure 4).

Exemple : *Salmonella* et *Shigella*.

- **Type zipper** : induit par interaction directe (et de haute affinité) entre une protéine de la surface bactérienne et un récepteur de la cellule hôte. La bactérie s'enveloppe progressivement de la membrane plasmique comme un fermeture éclair qui se ferme jusqu'à ce qu'elle soit internalisée (Figure 4).

Exemple : *Yersinia* : interaction avec une intégrine

Listeria : interaction avec une E. cathédrine ou avec un récepteur au complément gC1q-R.

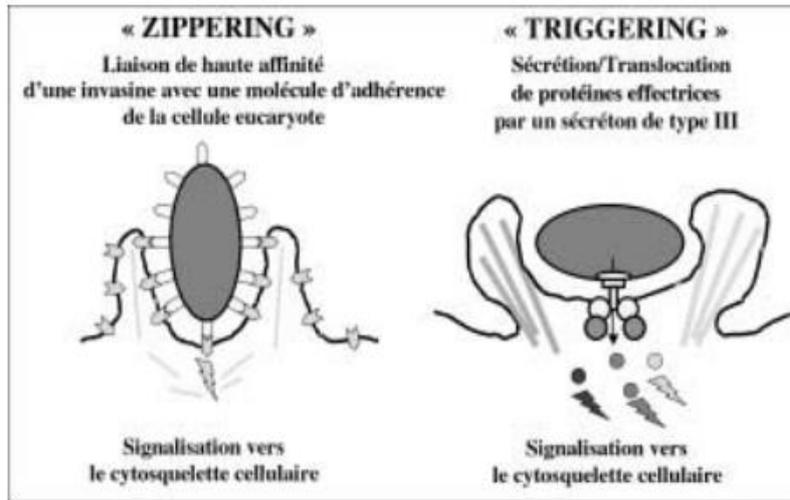


Figure 14 : Les deux principaux mécanismes moléculaires d'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales.

Dans les 2 types de mécanismes, des voies de signalisation complexes partant des récepteurs membranaires, entraînant une augmentation de la phosphorylation des protéines sur des résidus tyrosine (activation d'une voie de transduction de signal) aboutissent souvent à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à la formation de vacuole de macro- pinocytose. Exemples :

- ✓ **yersinia** : L'invasine de la membrane externe de Yersinia interagit avec le récepteur intégrine β 1 et favorise l'activation de RhoGTPase Rac1, qui indirectement module le métabolisme du phosphatidylinositol et induit des réarrangements de l'actine au site d'entrée de la bactérie permettant l'invasion de la cellule. Des kinases de l'hôte comme FAK or Src participent également au processus (Figure 4A).
- ✓ **Salmonella** : injecte des effecteurs dans la cellule cible. Certains de ces effecteurs entraînent l'internalisation de la bactérie. Parmi ces effecteurs (Figure 4B) :
 - **SipC** fait partie du TTSS et conduit à la polymérisation de l'actine et la formation de filaments
 - **SopE** active les Rho GTPases, favorisant la polymérisation d'actine et la formation d'un enflement au niveau de la membrane de l'entérocyte.
 - **SopB** module le métabolisme inositol-polyphosphate activant indirectement les mêmes Rho GTPases comme SopE; et
 - **SipA** bloque le facteur Cofiline de dépolymérisation de l'actine, favorisant aussi la formation d'un enflement membranaire

- **SptP inactive les Rho** GTPases une fois la bactérie internalisée, inhibe la polymérisation de l'actine et aidant à la fermeture de la membrane plasmique autour de la bactérie internalisée.

- ✓ **Shigella** : injecte une vingtaine de protéines dans le cytoplasme via le système de sécrétion type III, dont les protéines Ipa A ,IpaB, Ipa C et IpaD requises pour l'entrée. Ipa B secrétées dans le milieu extracellulaire peut lier les récepteurs integrine $\alpha 5\beta 1$ et CD44 d'où activation des voies de transduction du signal (Figure4 C).

Les protéines Rac, Cdc42et Rho semblent être activées successivement.

IpaC : permet la nucléation des filaments d'actine ;

VirA : indirectement stimule la RhoGTPase Rac1 favorisant la polymérisation de l'actine (tyrosine kinases Abl/Arg de l'hôte active également indirectement Cdc42 and Rac1) et inhibe la polymérisation des microtubules

IpgD : affecte Le métabolisme phosphoinositide et permet l'extension de la membrane par diminution des interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette.

IpaA : active la vinculine une protéine de l'hôte induisant la dépolymérisation de l'actine et le rétablissement de l'architecture membranaire après internalisation de la bactérie.

IpaC : initie le foyer d'entrée de la bactérie

- ✓ **Listeria** : envahie les cellules de l'hôte suivant deux voies : InIA et InIB .

InI A interagit avec la molécule d'adhésion E-cadhérine. Plusieurs molécules intracellulaires sont essentielles pour l'entrée de *Listeria* dans les cellules, par exemple :

- les caténines (impliquées dans la liaison de la E-cadhérine à l'actine) .
- La myosine VIIA probablement génère une force contractile nécessaire à l'internalisation bactérienne.
- D'autres molécules comme RhoGTPase Rac1 sont impliquées dans la polymérisation de l'actine (Figure 4 D).

L' InI B interagit avec le récepteur du premier composant de la cascade du complément C1q (gC1q-R), le récepteur du facteur de croissance hépatocytaire (c-Met) qui active des molécules (adaptators) qui agissent sur d'autres molécules comme le PI3K (impliquée dans l'activation des RhoGTPase Rac1 et la polymérisation de l' actine).

Un équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine est contrôlé par la régulation des activités de Lim-kinase et la cofiline permettant ainsi l'entrée bactérienne dans la cellule(Figure 4E).

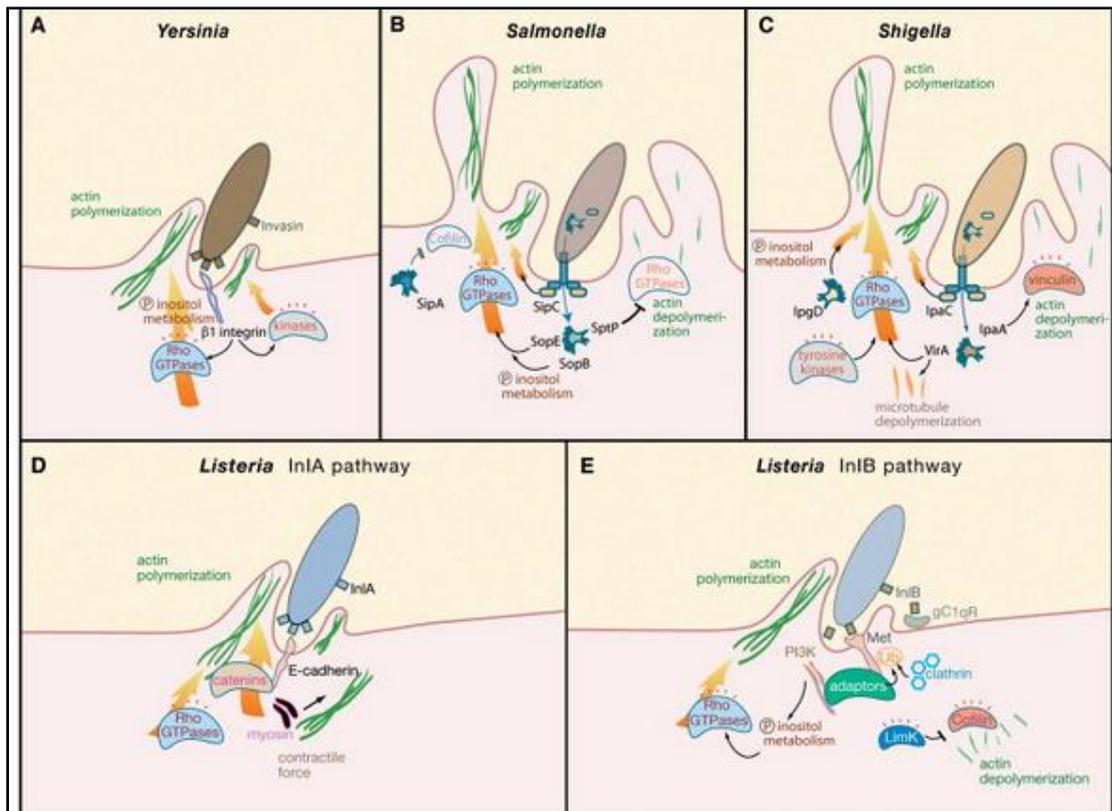


Figure 15 : Stratégies moléculaires de l'invasion par yersinia, Salmonella, Shigella et Listeria.

9-3-2 Colonisation du cytoplasme et dissémination cellulaire

Une fois internalisée la bactérie peut soit :

- S'échapper du phagosome, vivre dans le cytoplasme et se déplacer dans et entre les cellules. Exemple : Shigella et Listeria.
- Bloquer la maturation du phagosome y vivre et s'y multiplier. Exemple : Salmonella
- Plusieurs étapes de l'infection sont méditées par des effecteurs bactériens et délivrés à la cellule hôte par un système de sécrétion type trois TTSS

9-3-2-1 Le Système de sécrétion type trois (TTSS)

Nano machine, complexe, permettant à la bactérie d'injecter à l'intérieur de la cellule hôte des molécules effectrices. Constitué d'un

-bulbe cytoplasmique

-De structures en disque traversant la membrane externe et interne.

- Une structure en seringue qui traverse les structures précédentes et émerge à travers la membrane externe.

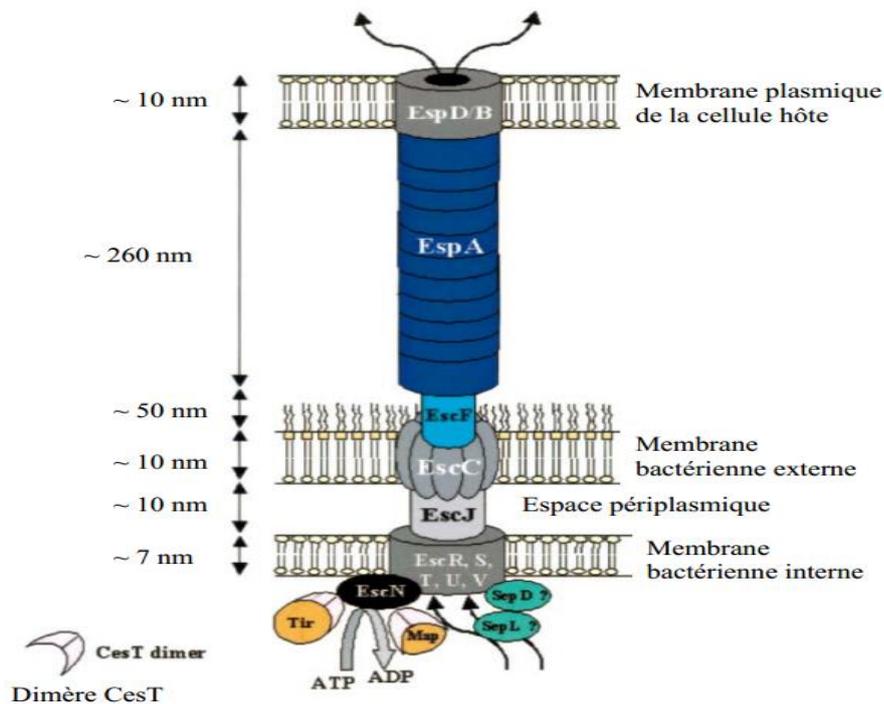


Figure 16 : Représentation schématique de l'appareil de sécrétion type trois des ECEP

Le corps basal du SST3 est composé d'une sécrétine (protéine qui forme un large canal dans la membrane externe) EscC,

Des protéines de membrane interne EscR, EscS, EscT, EscU et EscV forment un anneau dans la membrane interne

la lipoprotéine EscJ lie les structures en anneau. EscF constitue la structure ressemblant à une aiguille

les sous-unités EspA polymérisent pour former le filament EspA.

Les protéines EspB et EspD forment le port de translocation dans la membrane plasmique de la cellule hôte connectant la bactérie et la cellule eucaryote.

L'ATPase cytoplasmique EscN fournit l'énergie au système en réalisant l'hydrolyse des molécules d'ATP en ADP.

SepD et SepL sont des composés cytoplasmiques du SST3.

Les effecteurs Tir et Map se fixent aux protéines chaperons Ces qui se lient à EscN et assurent la translocation des deux effecteurs par le SST3

9-3-2-2 Exemple Shigella

Shigella pénètre dans l'épithélium par les cellules M ou phagocytée par les cellules dendritiques (macrophages).

L'entrée de Shigella implique le TTSS (Mxi-spa) qui injecte dans la membrane de la cellule hôte les effecteurs Ipa B et IpaC (invasion plasmide antigène) qui forment un pore permettant le transfert d'autres effecteurs ce qui induit une cascade de signalisation aboutissant à l'internalisation de la bactérie.

Shigella s'évade de la vacuole par une utilisation d'une phospholipase.

La mobilité intracellulaire de Shigella est facilitée par la protéine IcsA qui permet la nucléation et la polymérisation de l'actine et permet le déplacement de la bactérie dans le cytoplasme qui sera ensuite endocytosée par les cellules adjacentes. Ce qui entraîne une colonisation massive de l'épithélium.

Une fois dans le dôme folliculaire, pour survivre Shigella provoque l'apoptose du macrophage en activant la caspase I par Ipa B ce qui entraîne la maturation de deux cytokines: l'IL 1 β et l'IL18 (Figure 7).

Ceci entraîne une inflammation et destruction rapide de l'épithélium d'où Diarrhée (selles contenant sang et leucocytes), fièvre, nausées et vomissement.

:

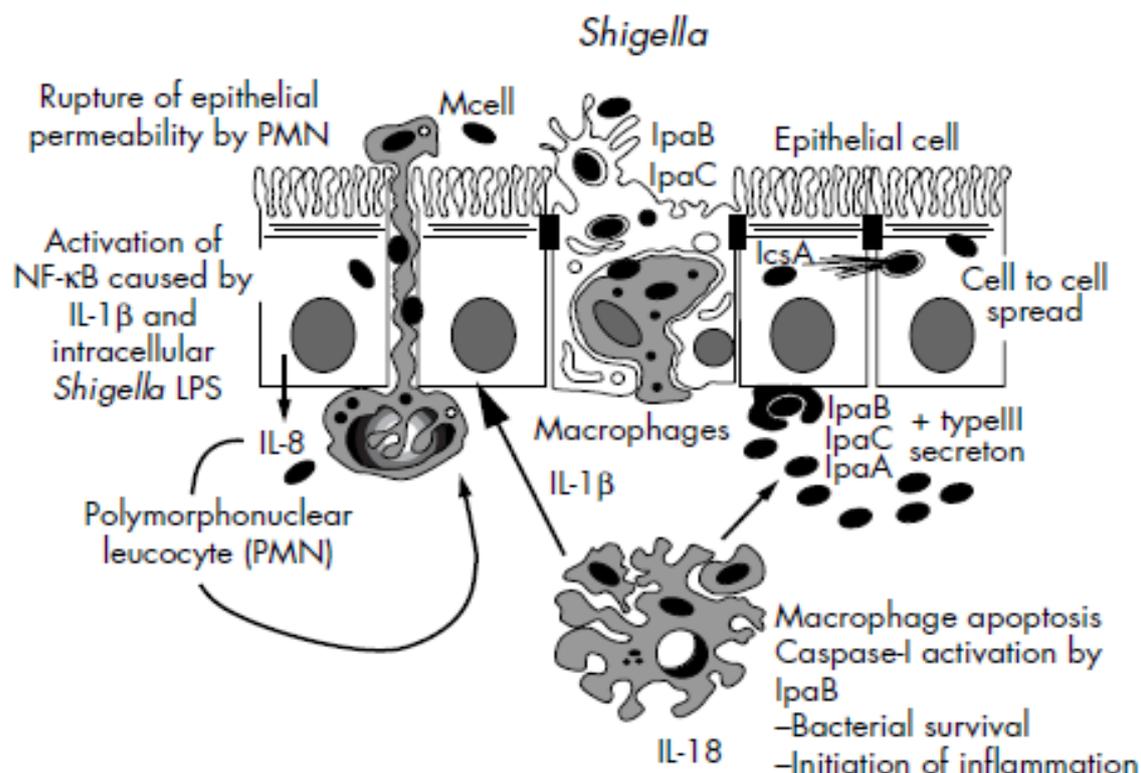


Figure 17 : Schéma physiopathologique de l'infection par Shigella

9-3-2-3 Exemple Salmonella

Trois portes d'entrée sont utilisées par Salmonella pour traverser l'épithélium intestinal (figure 9):

- l'invasion des cellules M,
- l'invasion des entérocytes et
- la capture luminale par les cellules phagocytaires CD18+.

Véhiculées par les macrophages résidents ou les cellules CD18+ Les Salmonelles rejoignent ensuite la voie lymphatique jusqu'au ganglion mésentérique puis la voie sanguine en cas de dissémination systémique.

L'internalisation de Salmonella nécessite adhésion par des fimbriae ou autre (exemple :LpfC)

Après internalisation Salmonella donne lieu à la formation d'une vacuole atypique (SCV)

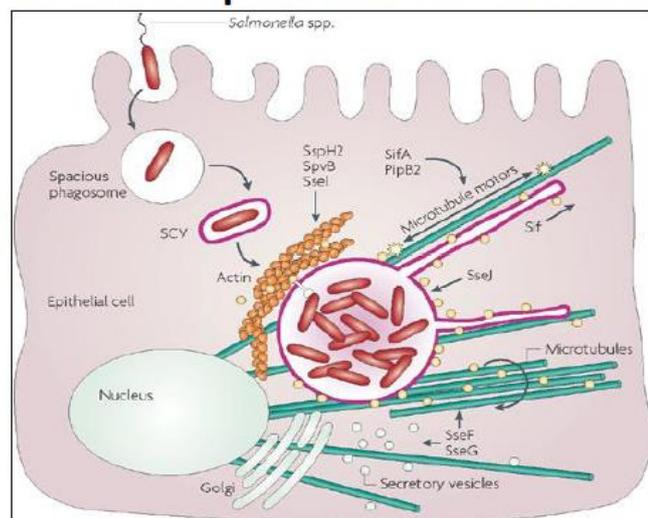
Elle bloque la maturation du phagosome (qui n'acquiert pas les marqueurs de maturation tardive du lysosome).

Ce phénomène est lié à l'expression d'un îlot de pathogénicité SPI2 codant pour un second TTSS à travers lequel salmonella injecte dans la cellule hôte des molécules effectrices.

Salmonella se multiplie à l'intérieur de la vacuole (figure 18).

Salmonella enterica: répllication intra cellulaire

- Après endocytose, les bactéries sont contenues dans le phagosome
- Le phagosome se transforme rapidement en vacuole (SCV) dont le pH est acide
- Adaptation de la bactérie à l'environnement SCV
- Activation du SSTT SPI-2 et sécrétion d'effecteurs bactériens à travers la membrane du SCV :
 - Modification du cytosquelette : SspH2, SpvB, SseI, SseF, SseG, ...
 - Formation de filaments (Sif): SifA, PipB2
- Augmentation de la taille du SCV et répllication de la bactérie



Le SST SPI-2 est impliqué dans la survie et la répllication de la bactérie dans la vacuole (SCV)

Figure18 : Répllication intracellulaire de salmonella enterica.

Dans le dôme *Salmonella typhimurium* cause la mort des macrophages (permet la libération des bactéries) infectés via sip (Salmonella invasion protein) qui active la caspase 1.

Parallèlement à l'apoptose des macrophages salmonella à développer un autre mécanisme lui permettant de survivre dans les macrophages (figure 9).

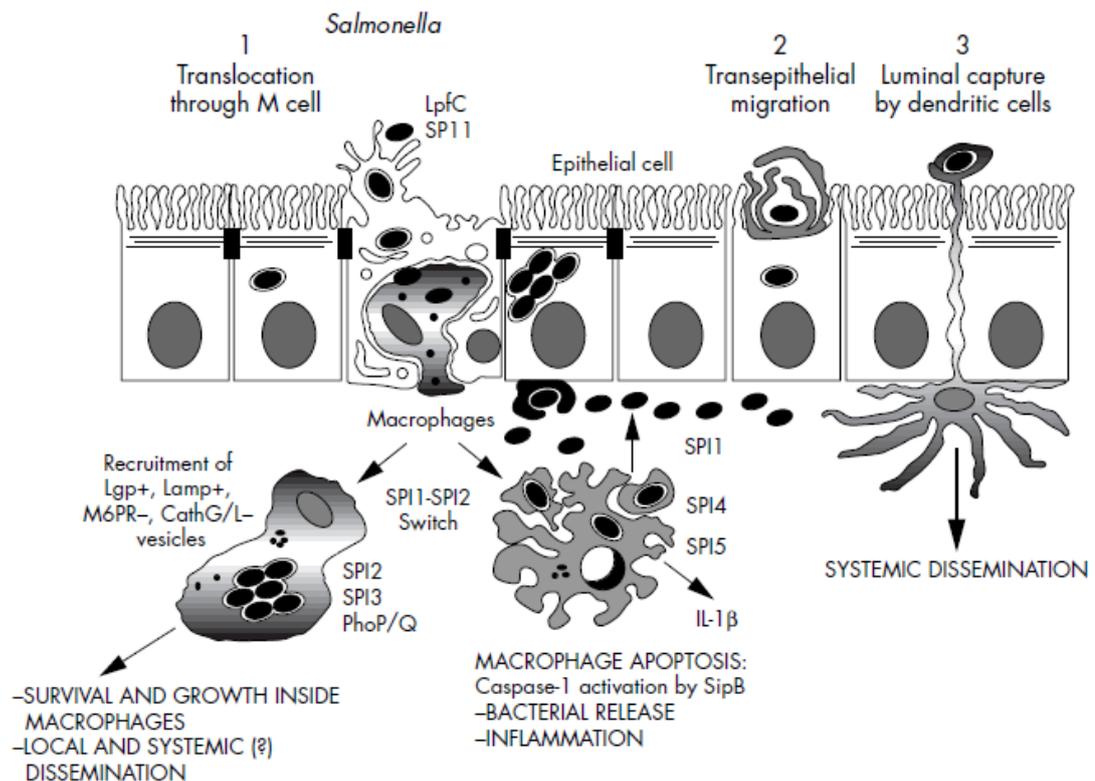


Figure 19 : Traversée de la barrière intestinale par Salmonella

9-3-2-4 Exemple *Listeria monocytogenes*

Le cycle intracellulaire de *listeria monocytogenes* (figure 8) :

- 1) adhésion à la surface des cellules épithéliales par IntA et Int B respectivement au niveau de la E.cadherine et le recepteur Met.
- 2) internalisation de listeria dans une vacuole phagocytaire.
- 3) lyse de la membrane vacuolaire par la listeriolysine O : LLO et la phospholipase C .
- 4) La protéine ActA de listeria, agit sur l'actine du cytosquelette et facilite le mouvement de la bactérie (formation de comètes).
- 5) la bactérie utilise les filaments d'actine pour sa mobilité et sa dissémination dans les cellules voisines.

6) *Listeria* est internalisée par la cellule voisine et se trouve dans une vacuole à double membrane qu'elle va lyser (LLO et phospholipase PlcB) pour recommencer un nouveau cycle d'infection.

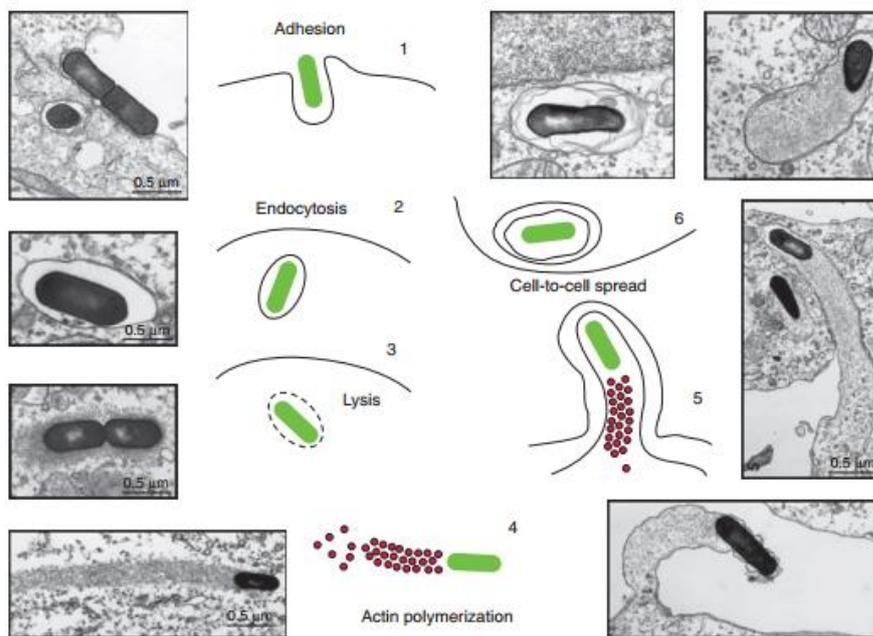


Figure 20 : Cycle de vie de *Listeria monocytogenes*.

9-3-2-5 Exemple de yersinia

L'internalisation de *Yersinia* se fait par Zippering et requiert une protéine de la membrane externe l'invasine (Inv).

Yersinia provoque l'apoptose des macrophages par YopP(yersinia outer proeins) secrété par son TTSS.

Yersinia peut également exercer sur les macrophages une activité anti- phagocytaire. Elle fait ceci par l'intermédiaire de l'injection, à travers le TTSS, de trois protéines effectrices, YopH T et E qui rompent l'assemblage du cytosquelette nécessaires au processus phagocytaire.

– Les protéines YOP (codées par un plasmide pYV) ont différentes actions au sein de la cellule eucaryote (cellules phagocytaires) :

- Apoptose
- Inhibition du TNF α
- Dépolymérisation de l'actine
- Phosphorylation
- Déphosphorylation

9-3-2-6 *Escherichia coli*

Les souches d'*E.coli* pathogènes intestinaux sont capables de se multiplier, de persister dans le tractus digestif, en contournant les défenses immunitaires de l'hôte, et d'induire des dommages cellulaires.

Ces souches ont développé différents modes d'interactions avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés pouvant être accompagnés de complications extradigestives.

Actuellement 7 pathovars d'*E.coli* sont reconnus (Figure 10) :

EPEC (Enteropathogenic *E.coli*):diarrhée infantine

ATEC :Atypical enteropathogenic *E.coli*

EHEC :Enterohaemoragic *E.coli*(colite hémorragique,syndrome hémolytique et urémique

ETEC (Enterotoxigenic *E.coli*):diarrhée infantine

EAEC (Effacing attaching *E.coli*):diarrhée persistante(adhésion et toxine)

EIEC (enteroinvasive *E.coli*): syndrome dysentérique

DAEC: diffusely adherent *E.coli*:diarrhée aqueuse

a) EPEC :

adhère à la surface cellulaire par un pilus BFP(bundle forming pilus) codé par un plasmide EAF(EPEC adherence factor) .Elle forme des microcolonies à la surface des cellules . Après attachement intime de l'intimine à son récepteur, elle provoque l'effacement des microvillosités (Figure 10a).

b) ATEC:Les *E.coli* entéropathogènes atypiques ne possèdent pas le plasmide EAF mais adhèrent aux cellules par l'intimine (Figure10 b).

c) EHEC : Attachement et effacement des microvillosités avec production de toxine SLT1(shiga like toxine) ou SLT2(Figure 10c).

d) ETEC : Adhère aux microvillosités par le facteur de colonisation CFA et libère la toxine thermolabile LT ou la toxine thermostable ST (codé par des plasmides) (Figure 10d)

e) EAEC : Attachement aux cellules et formation de biofilms à la surface des cellules et libération de cytotoxines et d'Entérotoxine (ShET1, Plc, EAST1,Pet) (Figure 10e).

f) EIEC : adhérence intime avec signalisation membranaire via un TTSS et invasion de l'entérocyte, puis lyse de la vacuole d'endocytose, multiplication intracellulaire et dissémination (Figure 10f).

g) DAEC : adhésion diffuse au récepteur cellulaire DAF (decay-accelerating factor) par des adhésines (F1845) et signalisation cellulaire conduisant à la formation de longues projections cytoplasmiques (Figure 10 g).

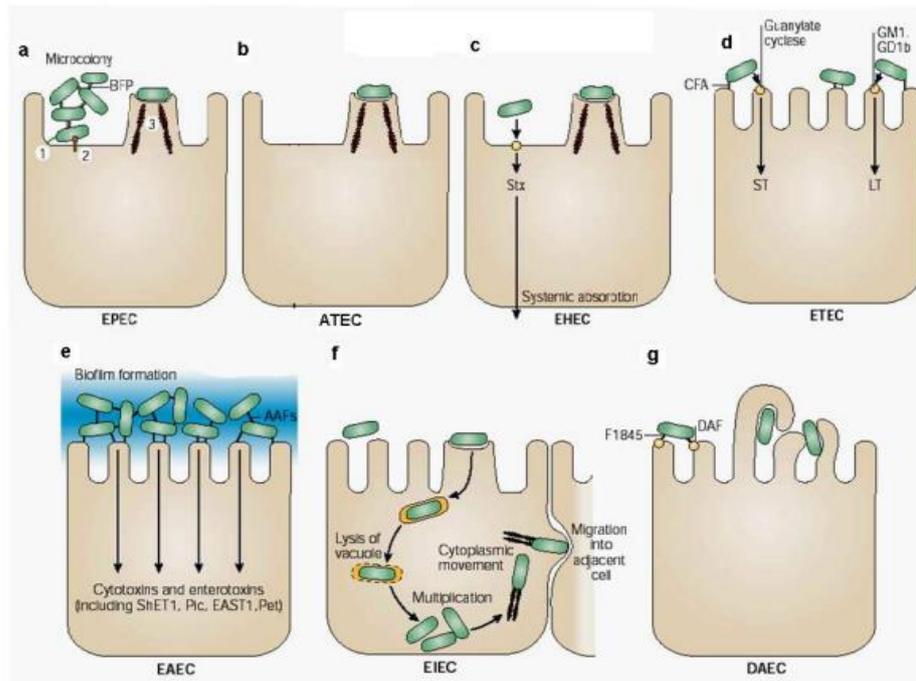


Figure 21 : mécanismes de pathogénicité des différents pathovars d'E. coli.

Les lésions d'attachement effacement provoquées par E.coli sont dues à plusieurs protéines dont le gène se situe dans le locus d'effacement des entérocytes (L.E.E.) :

- L'EPEC-secreted protein : codé par les gènes esp (espA, espB, ...). Cette protéine permet la translocation de la protéine Tir.
- La Translocated Intimin Receptor (Tir) : codé par le gène tir. Cette protéine est insérée dans la membrane plasmique après avoir été injectée dans la cellule cible par l'EPEC-secreted protein.
- L'intimine, codé par le gène eae. C'est une protéine membranaire de la bactérie qui lui permet d'adhérer aux entérocytes en se fixant aux protéines Tir inclus dans leur membrane. Elle permet l'effacement des microvillosités en agglomérant les molécules d'actine, qui permettent le maintien des microvillosités. On obtient alors une sorte de piédestal pour la bactérie à la surface de la membrane de l'entérocyte (figure 11 et 12).

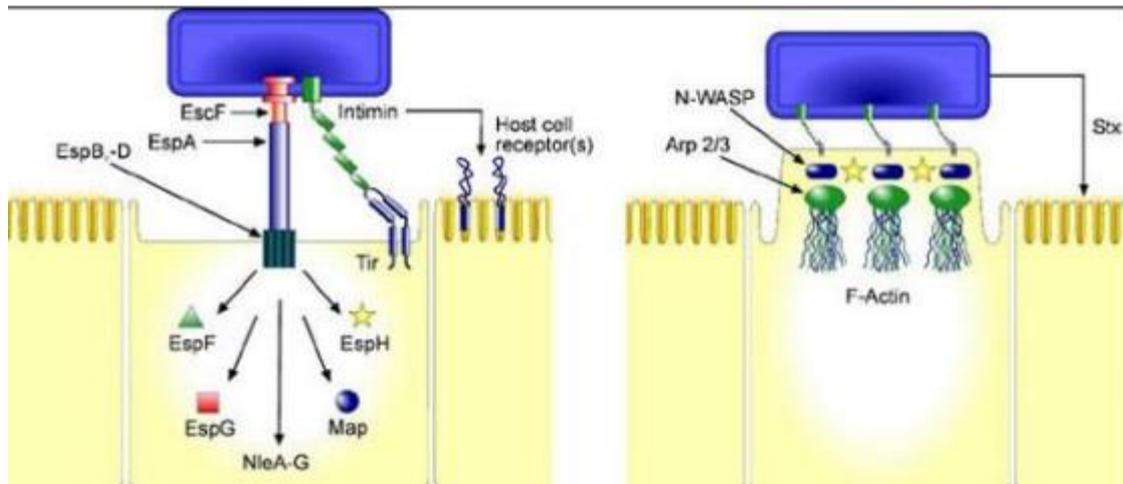


Figure 22 : **Lésion d'attachement effacement provoqué par les E.coli entérohémorragiques.**

Attachement intime de la bactérie par interaction de l'intimine avec Tir (protéine bactérienne sécrétée par le TTSS et insérée dans la membrane de la cellule hôte)

Formation de piédestal induite par la bactérie via Tir et TccP qui activent la polymérisation de l'actine(N-WASP et Arp2/3) et EspB qui affecte le cytosquelette de l'hôte.

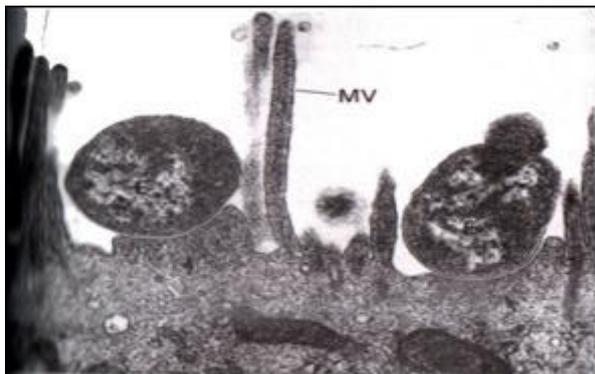


Figure 23 : **observation microscopique des lésions attachement /effacements sur les entérocytes humains.**

9-4 La toxinogénèse

La toxinogénèse est la capacité à produire des toxines .Les toxines sont de deux types:

- **les exotoxines:** sécrétées par la bactérie et libérées dans le milieu extérieur et sont de nature protéique, fortement immunogènes et thermolabiles.

- **Les endotoxines** : Liées à la membrane externe des bactéries Gram négatifs de nature liposaccharidique ou LPS. Elles sont thermostables, faiblement immunogènes et antigéniques.

9-4-1 Les exotoxines

Thermolabiles, immunogènes, On peut obtenir des anatoxines.

Ces exotoxines peuvent être classées selon leur structures et leur mode d'action on distingue alors les :

- ✓ Cytolysines
- ✓ Les toxines dimériques A/B
- ✓ Les oligopeptides
- ✓ Les super-antigènes
- ✓ Les effecteurs bactériens sécrétés par les systèmes de sécrétion type III et type IV.

Ou en fonction de leurs sites d'action : Entérotoxine, neurotoxine, Cytotoxines ... etc.

9-4-1-1 Les cytolysines

Perturbent la membrane cellulaire et entraînent la sécrétion d'ions et de métabolites et l'entrée de l'eau dans la cellule entraînant la mort et la lyse cellulaire. On distingue les phospholipases et les Toxines formant des pores.

-Les phospholipases

Hydrolysent les Glycérophospholipides et les sphingolipides des membranes cytoplasmiques

Exemple : La phospholipase PLc de *listeria monocytogenes* Qui permet leur évasion de la vésicule d'endocytose et de la vacuole à double membrane.

-Toxines formant les pores

Ces toxines forment un canal à travers la membrane cytoplasmiques de la cellule eucaryote cible à travers laquelle les ions et les métabolites quittent la cellule ce qui entraîne la lyse et la mort cellulaire.

Exemple :

- ✓ La toxine α de *Staphylococcus aureus*
- ✓ La listeriolysine LLO
- ✓ L'hémolysine α d'*E.coli*
- ✓ Hémolysine de *V. cholerae* : ELTor

Rôle des cytolysines dans la virulence :

- Tuer les cellules immunitaires
- Libérer les nutriments (Fer par exemple)
- Altérer les épithéliums pour se disséminer plus profondément et adhérer à la matrice extracellulaire.
- Echapper des phagosomes et échapper de la destruction du lysosome ensuite lyser les membranes cellulaires

9-4-1-2 Toxine dimérique AB :

Elles ont une activité intracellulaire, et sont constituée de deux sous unités :

- ✓ Une sous unité à activité enzymatique : A(activity)
- ✓ Une ou plusieurs sous unités B responsables de l'attachement à un récepteur spécifique (Binding).

Après internalisation et passage dans le cytoplasme les sous unité A interagissent avec leurs molécules cibles.

La pénétration des toxines dimériques dans le cytoplasme se fait soit par des ports ou par endocytose (figure24).

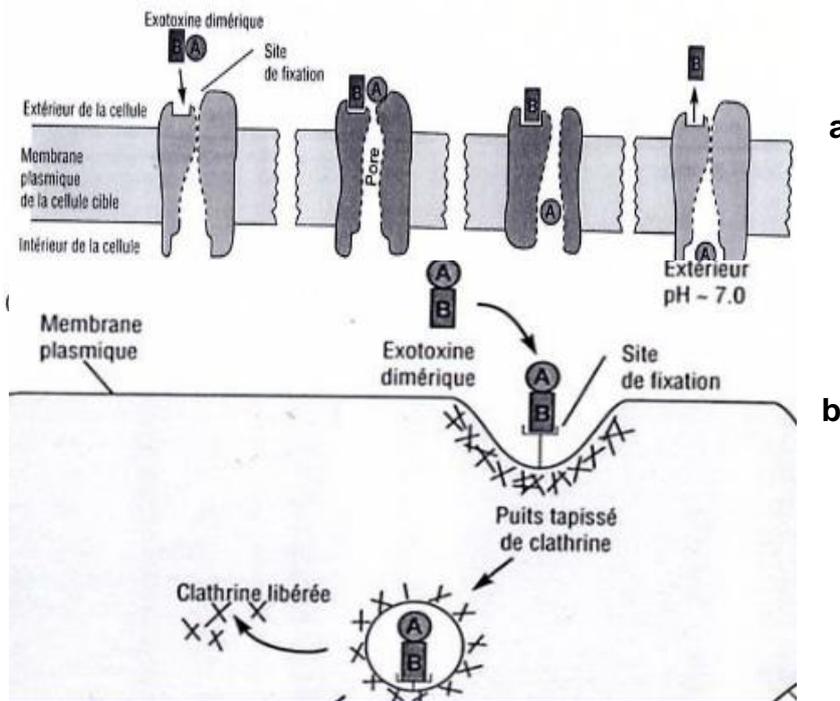


Figure 24 : Pénétration des toxines dimériques dans la cellule(a) via les pores (b)via des vésicules d'endocytose .

Plusieurs activités :

- ✓ ADP ribosylation : Toxine cholérique CT et la toxine thermolabile d'*E.coli* (LT)
- ✓ N- glycosidases : shigatoxine ,STL1 et STL2 d'*E.coli*
- ✓ Glycosyltransférase : toxine A et B de *Clostridium difficile*
- ✓ Endopeptidases Zn dépendant : neurotoxine botulinique.

ADP ribosylation: Toxine cholérique

Après attachement à un ganglioside récepteur GM1 la SU (B) forme un pore de 11à15 Å ,à travers lequel la SU(A) est transloquée dans le cytoplasme puis la SU A1 catalytique est libérée par rupture du pont disulfure qui la relie à A2.

A1 transfère un ADP ribose sur la SU régulatrice $G\alpha$ des protéines G dont la fonction est rendue constitutivement positive et permet ainsi l'activation permanente de l'adhényl cyclase .

Il en résulte une activation par l'adénosine mono phosphate cyclique de la protéine kinase A, responsable de l'altération du transport ionique par phosphorylation d'un certain nombre de protéines cibles entre autres le CFT (Figure 14).

toxine cholérique

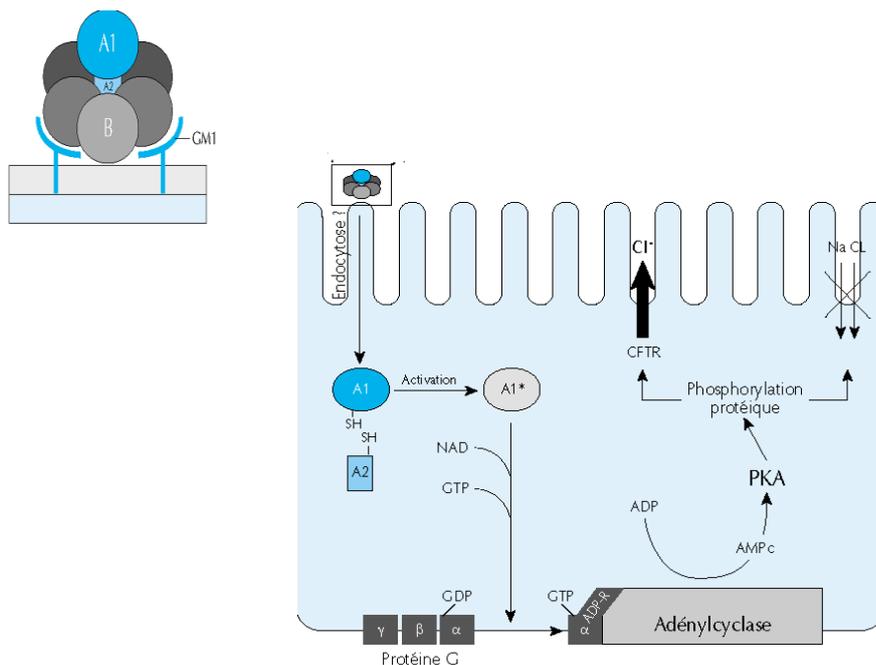


Figure 25 : mode d'action de la toxine cholérique

N-glycosydes: shiga -toxines

Les shiga toxines est un hétéropolymère de type A1/B5 sont composées d'une SU A catalytique et de 5SU B qui se lient au récepteur cellulaire :le globotriosyl céramide Gb3.c'est le glycosaccharide terminal de ce glycolipide qui est spécifiquement reconnu par la SU. B

la toxine est ensuite internalisée par endocytose.après fusion avec le lysosome, il y a protéolyse et réduction des ponts disulfures et libération de la SU A1 qui est une N-glycosidase capable d'hydrolyser l'adénosine 4324 de l'ARNr 28S ce qui inhibe la fonction d'élongation des ribosome et inhibe la synthèse protéique, ce qui entraine l'apoptose cellulaire(Figure 15).

Les shiga toxines sont codées par le gène stx porté par un prophage. Les E.coli porteurs du gène stx sont dites **STEC**.

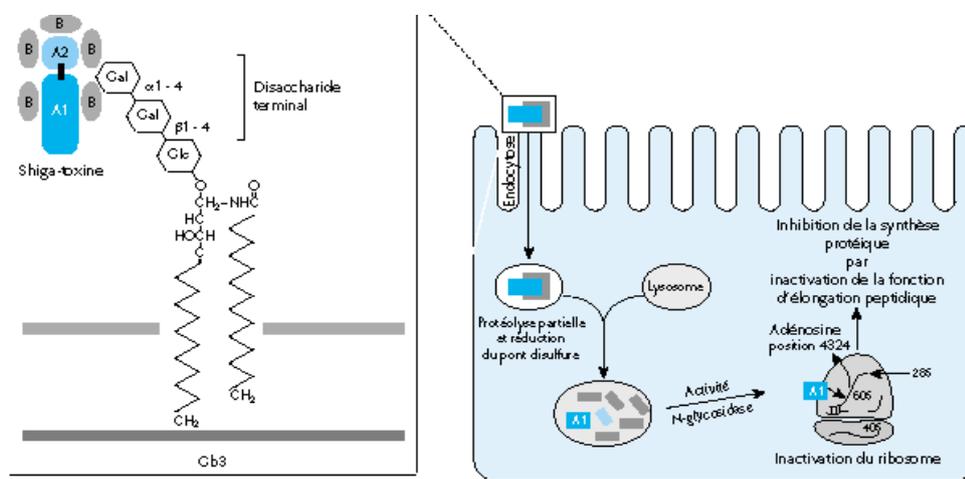


Figure 26 : Structure et mécanisme d'action des Shiga -toxines

9-4-1-3 Les oligopeptides :

Agissent par activation, après liaison sur les récepteurs transmembranaires spécifiques, d'enzymes intra -cytoplasmiques des cellules cibles :

Exemple : La toxine STa d'ETEC dont le récepteur membranaire a une activité guanylate cyclase et la Toxine botulinique

Toxine botulinique

BoNT :La toxine est un polypeptide à deux chaînes, une lourde (H : Heavy) et une légère (L : Light). La chaîne lourde de 100 kDa est liée à une chaîne légère 50 kDa par un pont disulfure. La chaîne lourde lie la molécule de toxine sur le récepteur neuronal et permet alors la translocation de la chaîne légère, qui porte l'activité enzymatique de la molécule de toxine. Cette chaîne légère est une enzyme (une protéase) qui attaque le complexe SNARE aux jonctions neuromusculaires, empêchant des vésicules de fusionner à la membrane pour libérer l'acétylcholine. Il en résulte une paralysie flasque.

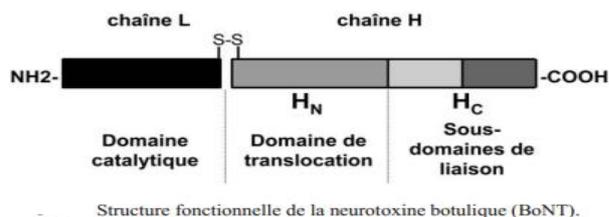


Figure 27 : Neurotoxine -toxine botulinique

9-4-1-4 Les super antigènes :

Contrairement aux antigènes conventionnels, les super-antigènes ne sont pas internalisés, apprêtés et présentés par des cellules présentatrices de l'antigène. Bien au contraire, ils se lient directement aux molécules de classe II du CMH, apparemment hors de la cavité de liaison à l'antigène.

Ces antigènes se lient vraisemblablement à une région exposée du feuillet bêta plissé situé sur le côté du récepteur des cellules T,

Les super-antigènes peuvent activer un grand nombre de cellules T, indépendamment de leur spécificité antigénique. Bien que moins de 0,01 % des cellules T répondent à un antigène conventionnel donné, entre 5 et 25 % des cellules T peuvent répondre à un super-antigène particulier (figure 17).

Ainsi, l'activation est polyclonale et peut intéresser un pourcentage important de la population Th totale. Les activations massives qui suivent la liaison croisée par un super-antigène se traduisent par une surproduction de cytokines des cellules Th, ce qui conduit à une toxicité systémique.

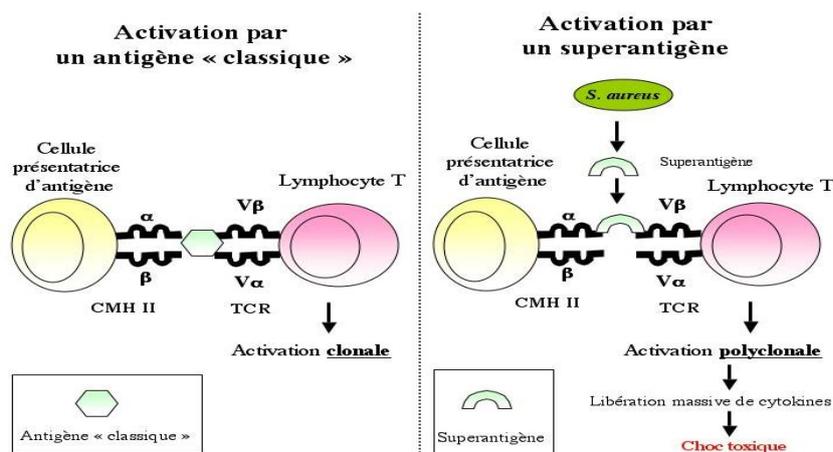


Figure 28 : Les super antigènes ou immunotoxines.

Un **super-antigène** est une molécule bivalente qui se fixe :

- d'une part à l'**extérieur** des molécules de classe II de la cellule présentatrice d'antigène.

- d'autre part à l'**extérieur** du TCR des lymphocytes Th2, en reconnaissant certaines chaînes Vb .

Un super-antigène est **un activateur polyclonal** car tous les lymphocytes Th2 possédant une chaîne reconnue par le super-antigène sont activés.

L'activation entraîne une production et une libération massive de **cytokines inflammatoires** (IL-2, IFN g et TNF a) tant par le lymphocyte Th2 que par la cellule présentatrice d'antigène.

Exemples de super antigènes :

a-Toxine-1 du syndrome du choc toxique (TTST-1)

Elles sont produites par les staphylocoques aureus. Leurs actions portent sur le tube digestif, par l'intermédiaire du système nerveux:

b -Les entérotoxines staphylococciques

Elles sont au nombre de cinq : A, B, C, D, et E à l'origine d'intoxications alimentaire. Les entérotoxines staphylococciques A et B traversent la barrière intestinale et activent une réponse immunitaire locale et systémique au cours de laquelle des médiateurs inflammatoires solubles sont produits ; ces médiateurs sont responsables des symptômes. Elles sont très stables, et résistent à la plupart des enzymes protéolytiques. Elles gardent ainsi leur activité après ingestion d'aliments contaminés, dans le tube digestif.

9-4-1-5 Les effecteurs bactériens injectés par systèmes de sécrétion.

Plusieurs toxines sont injectées dans les cellules hôte par des systèmes de sécrétions comme les TTSS. Ces toxines permettent soit :

✓ **La survie extracellulaire**

Exemple Yersinia : secrète des molécules effectrices anti-phagocytaires provoquant la paralysie du cytosquelette des phagocytes ce sont YopE ,H,T(Inhibition protéine G, kinase/phosphatase, adénylate cyclase) et d'autre provoquant l'apoptose des macrophages (MAP kinase) YopP

✓ **Entrée et Survie intracellulaire :**

Plusieurs toxines secrétées par le TTSS induisent le réarrangement du cytosquelette permettant à la bactérie d'entrer et se déplacer dans les cellules.

Shigella injecte dans la cellule eucaryote (Ipa) et Vir, Salmonella (Sip) et E.coli EspG .

✓ **Interférence avec le système immunitaire :**

Shigella : OspG retarde la dégradation du NFκB

9-4-1-6 Enzymes permettant la diffusion dans les tissus

Certaines enzymes n'ont pas d'effet toxiques sur la cellule de l'hôte mais ils permettent la diffusion bactérienne dans les tissus par dégradation de molécules jouant un rôle important dans l'intégrité des tissus comme les Hyaluronidases, neuraminidases, DNases, Collagénases, élastases, protéinases et lipases.

D'autres permettent l'échappement aux défenses de l'hôte comme la Coagulase et la catalase ou l'acquisition de nutriments comme l'uréase.

9-4-2 l'endotoxine ou LPS

La plupart des bactéries gram négatives ont dans la membrane externe de leur paroi un lipopolysaccharide LPS. Le LPS est une endotoxine libérée lors de la lyse bactérienne et aussi pendant la multiplication cellulaire.

Le LPS comprend trois régions distinctes : le lipide A : toxine, Le core et L'antigène O.

Le lipide A relié par un tri-saccharide (le 2 céto-3-désoxyoctonate ou KDO) au polysaccharide de base (core) sur le (core) sont greffées des chaînes latérales qui portent les spécificités O. Le « core » diffère des chaînes latérales par la composition en sucres, les liaisons des sucres entre eux. La structure du polysaccharide de base est la même pour toutes les bactéries d'une même espèce (Figure 18).

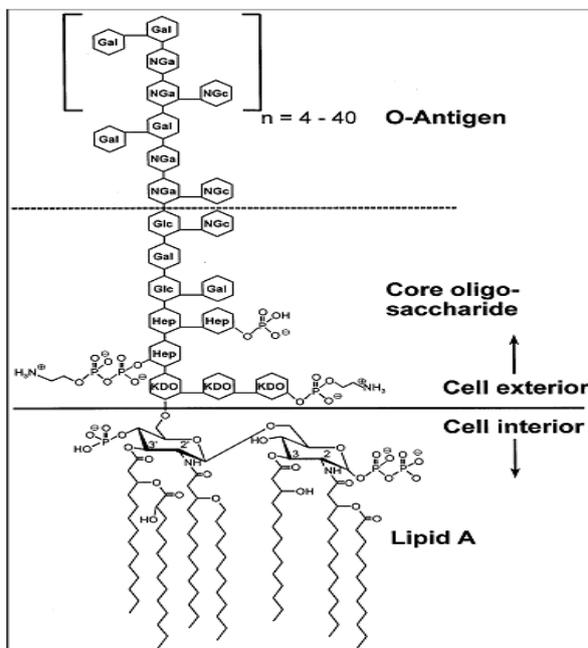


Figure 29 : structure du LPS d'E.coli K12

Caractéristique du LPS

- Le lipide A est résistant à de très nombreux agents physiques ou chimiques.
- Il n'est pas désactivé par le formol ou la chaleur, il ne peut pas être transformé en anatoxine.
- Libéré lors de la lyse bactérienne
- Il est reconnu par le TrL4 un Toll récepteur de l'immunité ce qui provoque la transduction du signal. Il en résulte :
 - Activation du complément
 - Activation des facteurs de coagulation
 - Production de cytokines (IL1,IL6 ,IL8)et le TNF α .
 - Choc Toxique

Le tableauXI résume l'effet de l'endotoxine sur l'hôte.

Tableau XI : Action de l'endotoxine sur l'hôte.

Effet pyrogène	Action sur les macrophages qui produisent des pyrogènes Endogènes (IL-1et TNF) qui agiront par voie sanguine sur les centres thermorégulateurs de l'hypothalamus
Effet vasculaire	Activation de substances vasoactives impliquées dans l'état de choc(hypotension ,cyanose, acidose)
Activation du système du complément	Provoque le clivage de C3 : effet anaphylactique et effet chimiotactique sur les polynucléaires
Coagulation intravasculaire disséminée	Défibrination ce qui donne des nécroses hémorragiques au niveau de différents organes
Effets immunostimulants	Activation des macrophages et stimulation des lymphocytes B
Effet intestinaux	Diarrhées

9-5 Support génétique de la pathogénicité

Les différents modèles d'infection reflètent une différence génétique entre ces bactéries.

De nombreux gènes codant pour des propriétés de virulence des bactéries ont une origine étrangère, comme l'attestent le G+C %. Ils sont acquis par transfert horizontal de gènes par :

- Plasmides.
- Transposons (toxine TS *E.coli*).
- Bactériophages (toxine cholérique CTX ϕ , shigatoxine)
- L'intégration d'îlot de pathogénicité ou PAI (pathogenicity Island) exemple le locus d'effacement chez *E.coli* (LEE).

Selon le pathovar on trouvera différents éléments qui ont été transmis par transfert horizontal de l'information génétique.

Ainsi les souches d' *E.coli* produisant une dysenterie, une méningite, une diarrhée, une infection urinaire ou un syndrome d'hématurie portent des éléments génétiques différents qui leur confèrent de facteurs de virulences spécifiques leur permettant de coloniser et de survivre dans des environnements spécifiques.

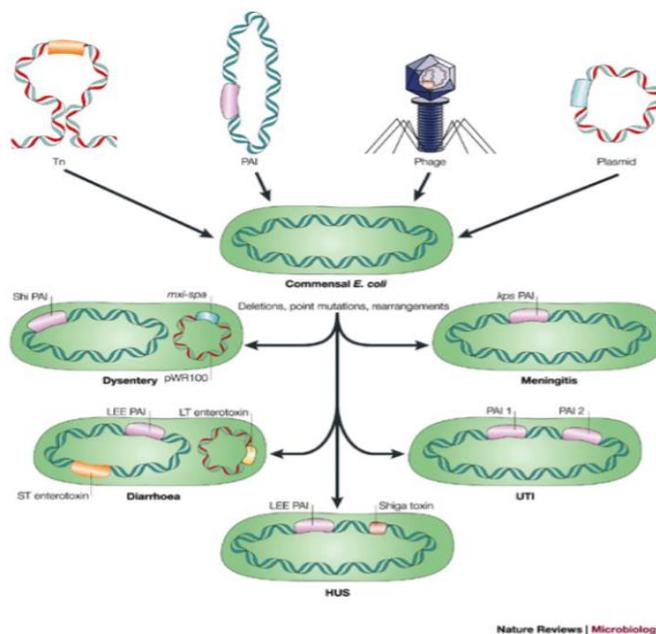


Figure 30 : Contribution des éléments génétiques mobiles dans l'évolution d'*E.coli* commensale.

Les îlots de pathogénicité :

Les îlots génomique ou îlots de pathogénicité sont de grande région d'ADN (> 10 Kbase), codant le plus souvent pour des facteurs de virulence, ils ont un % G+C différent de l'ADN de la bacteria (origine étrangère), et sont flanqués par des séquences en répétition directe DR (direct repeats.), en association avec les gènes ARNt et/ou des séquences d'insertion (IS) et portant des gènes de mobilité (intégrases *int* et transposases). Figure 20

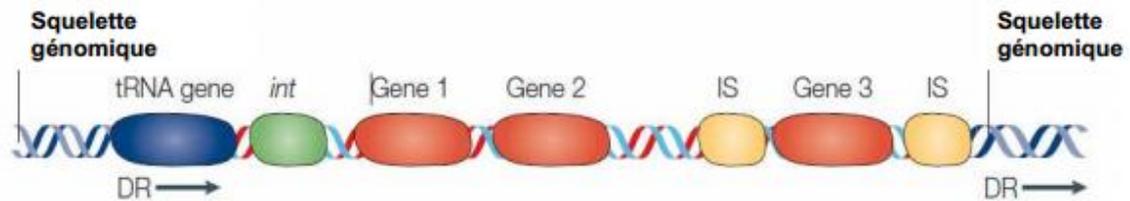


Figure 31: Caractéristiques générales d'un îlot génomique.

Exemples:

- ✓ **E.coli**: les facteurs de virulence d'E.coli sont codés soit par un plasmide, un îlot de pathogénicité ou un bactériophage intégré au chromosome (Figure 21).

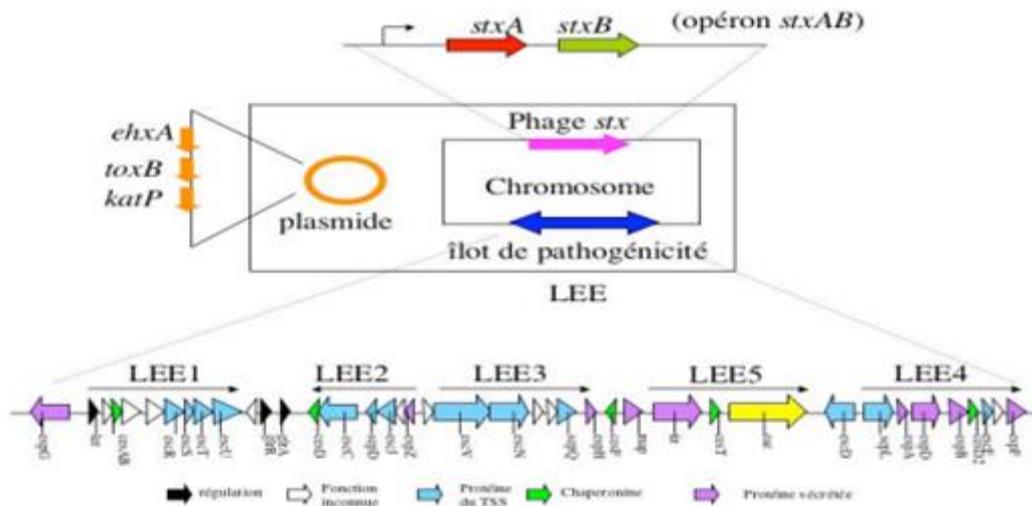


Figure 21 : 1. Schéma des principaux éléments génétiques responsables de la virulence des *E. coli* producteurs de Shigatoxines. Sur le chromosome, on trouve principalement : l'îlot de pathogénicité LEE comprend 40 grilles ouvertes de lectures (flèches) et 5 unités de transcription (LEE1 à LEE 5). Les gènes du LEE codent pour l'intimine (gène *eae*), des protéines sécrétées par le TTSS ou des chaperonines. Le LEE est impliqué dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement. Des bactériophages intégrés dans le chromosome bactérien portent les opérons *stxAB* qui codent pour les Shigatoxines. A côté du chromosome on trouve un plasmide de haut poids moléculaire qui porte des gènes codant pour des facteurs potentiellement impliqués dans la virulence comme les gènes *ehxA* codant pour l'entérohémolysine, le gène *toxB* codant une adhésine et le gène *katP* codant pour une catalase-peroxydase.

Régulation du LEE :

Elle se fait par quorum sensing qui est un mécanisme permettant l'expression de certains gènes en fonction de la densité bactérienne.

Le 1^{er} gène de LEE1(*ler*) code pour une protéine de régulation qui fait partie d'une cascade de régulation .(*ler*) active l'expression de LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5 (LEE1 n'est pas régulé par *ler*). LEE1 est régulé par Per (plasmidique encoded regularor) codé par l'opéron *perABC* . La régulation de LEE par Per est modulée par différents signaux environnementaux.

LEE est également négativement régulé par la protéine histone -like (H-NS),il est régulé également par l'IHF(Integration host factor) un régulateur global essentiel pour l'expression de *ler*.

L'expression des molécules de Quorum sensing activent LEE1 et LEE2 .LEE1 à son tour active LEE3 et LEE4(Figure 22).

LEE1, LEE2, LEE3 codent pour des TTSS, Lee4 code pour les effecteurs sécrétés, LEE5 code l'intimine et Tir.

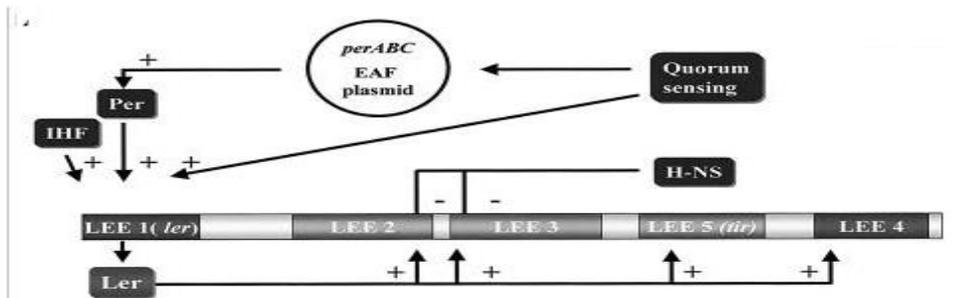


Figure 33 : Régulation de l'expression du LEE (Clin Microbiol Rev. 2004 . 17(1): 14–56.)

✓ **Ilot de pathogénicité de *Listeria monocytogenes* :**

Les gènes de virulence de *L.monocytogenes* sont réparties en îlot chromosomiques de pathogénicité autour du gène *hly* (codant pour la listériolysine O), avec en amont l'opéron lécithinase rassemblant les gènes *mpl* (codant une métalloprotéase zinc dépendante nécessaire à la maturation de la phosphatidyl-cholinephospholipase C) et les gènes *ActA* et *plcB*, et en aval l'opéron *prfA*.

Les gènes *inIA* et *inIB* se trouvent à une certaine distance sur le chromosome. L'ensemble des gènes de virulence est contrôlé par l'activateur transcriptionnel *PrfA* (Figure 23).

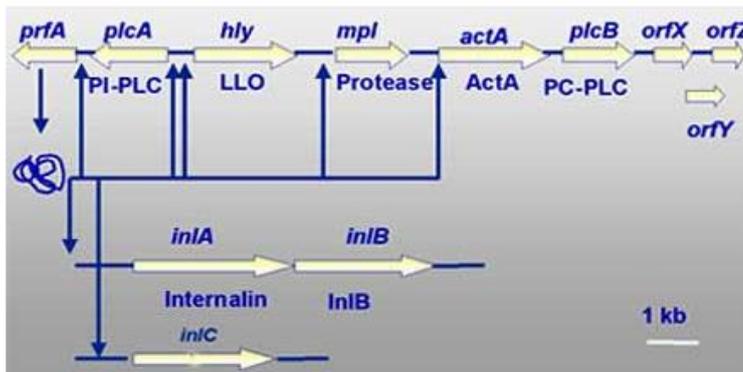


Figure 34: organisation de l'îlot de pathogénicité de *Listeria monocytogenes*.

9-6 : Autre facteurs de virulences :

9-6-1 Captation du fer :

Le fer est un élément indispensable à la survie des bactéries, seulement il ne se trouve pas à l'état libre dans les tissus de l'hôte, mais liée à des molécules comme l'hémoglobine, la transferrine ou à la lactoferrine. Pour s'approvisionner en fer les bactéries pathogènes ont développé cinq stratégies différentes :

- ✓ à partir des produits de dégradation de l'hémoglobine après hémolyse ;
- ✓ directement depuis la transferrine ou la lactoferrine de l'hôte par la production de récepteurs spécifiques ;
- ✓ indirectement depuis ces deux mêmes molécules par la production de sidérophores plus puissants ;
- ✓ indirectement par la production de récepteurs aux sidérophores produits par d'autres microorganismes ;
- ✓ depuis les pools intracellulaires de fer pour les bactéries pathogènes intracellulaires facultatives et obligées.

9-6-2 Echappement au système immunitaire :

Les pathogènes ont développé des mécanismes leur permettant de contourner le système immunitaire de l'hôte :

- Variation antigénique: changement qualitatif au niveau de la surface
- Variation de phase : expression ou non expression des composants de surface (exemple Salmonella deux types de flagelline H1 ET H2)
- Production d'une IgA protéase
- Occupation des espaces intracellulaires (éviter la destruction par le sérum et les leucocytes)
- Enveloppement dans les protéines de l'hôte.

Variation de phase

Exemple Salmonella: deux types d'antigènes flagellaire H1 et H2.

Switch au niveau de L'ADN :une enzyme de recombinaison peut inverser la région de l'ADN contenant le promoteur pour la transcription de H1(A) par un mécanisme de flip- flop.

Si A (H1) est transcrit le répresseur pour B(H2) est transcrit .

Si B est transcrit le répresseur pour A est transcrit

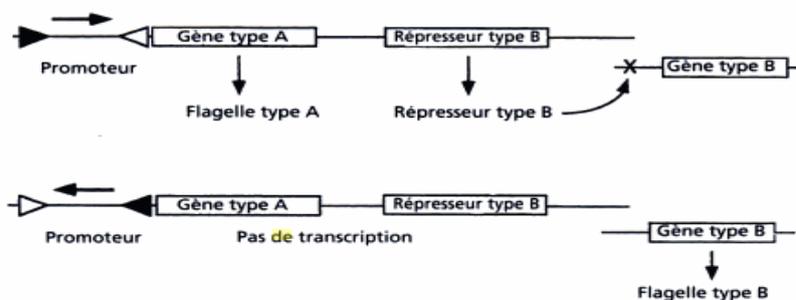


Figure 35 : variation de phase

Variation antigénique :

La variation antigénique est la capacité d'une bactérie de modifier certains antigènes majeurs exposés à leur surface (pili par exemple) au cours du processus infectieux.

Sur le chromosome se trouvent plusieurs copies muettes du gène et une copie complète. Les copies muettes n'ont pas de gène de régulation en amont.

Par recombinaison de l'ADN il ya déplacement de la copie du gène muet au sein de la copie complète d'où transcription du gène muet.

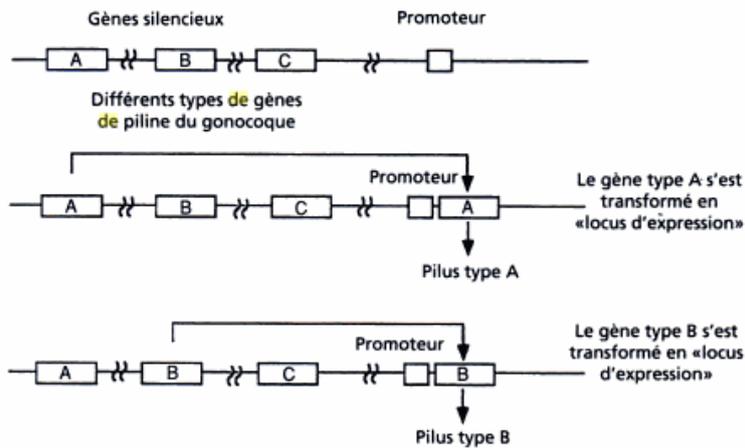


Figure 36 : variation antigénique.

10-Microbiologie prévisionnelle :

Le secteur de l'alimentation doit apporter la preuve de la qualité et de la sécurité de ses produits, Le consommateur étant de plus en plus exigeant sur la qualité des aliments qu'il consomme. Or La maîtrise des dangers microbiologiques nécessite une bonne connaissance des flores microbiennes et de leur évolution dans les produits, et demande donc des procédures expérimentales fastidieuses et coûteuses.

La microbiologie prévisionnelle est un outil qui permet de prévoir par des modèles mathématiques, l'impact de différentes conditions environnementales de température, de pH, d'activité de l'eau, de concentration en acides organiques et en inhibiteurs de leurs interactions éventuelles sur la croissance, l'inactivation ou la survie des microorganismes.

10-1 Définition et intérêt

C'est une science qui combine des données microbiologiques, des formules mathématiques et statistiques pour prévoir le comportement des microorganismes en fonction des conditions physicochimiques de l'aliment (pH, T°, Aw , conservateurs....)

Intérêt :

Appréciation du comportement des microorganismes dans une matrice alimentaire (en utilisant des modèles matrices/germes de référence).

Ces modèles permettent de prédire en fonction de la contamination primaire, des conditions de l'environnement ou du traitement subi tout au long de la chaîne de production et de distribution de l'aliment, la concentration du microorganisme dans l'aliment au moment de la consommation.

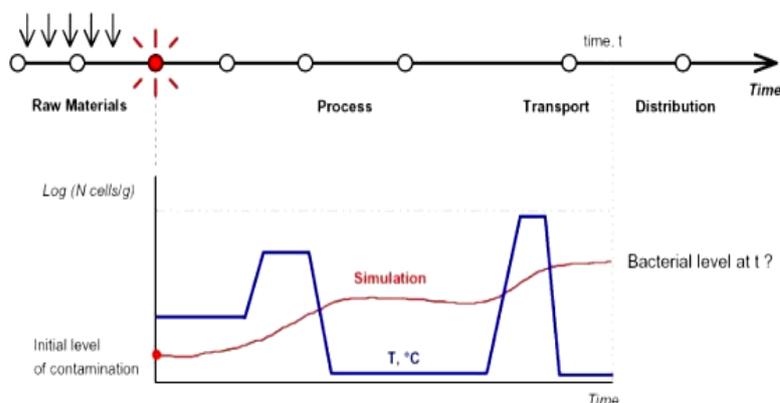


Figure 37 : Principe général de la microbiologie prévisionnelle

10-2 -Historique

1922 Esty et Meyer: modèles d'inactivation thermique des spores de *Clostridium botulinum*

1980 nombreux modèles de croissance et de décroissance.

1983 Roberts et Jarvis les premiers à inventer le terme « predictive microbiology »

1990 utilisation des modèles en appréciation des risques.

10-3- Principe de base

Les réponses de population de microorganismes à des conditions environnementales identiques sont reproductibles.

à partir d'observations disponibles sur la croissance , la survie ou l'inactivation des bactéries en fonction des facteurs environnementaux il est possible de prédire les réponses des mêmes microorganismes sous d'autres conditions ,en suivant les facteurs environnementaux plutôt que de faire des expériences microbiologiques lourdes et coûteuses.

10-4 -Objectifs

- Prévoir les dynamiques microbiennes (maîtrise des risques)
- ✓ Apporter une quantification plus accessible (précision du danger)
- ✓ Optimiser les procédés (sécurité et amélioration de propriétés sensorielles).
- ✓ Limiter les coûts et le temps des études expérimentales en ciblant mieux les analyses (Challenges tests virtuels)
- ✓ Fournir une illustration simple et adaptées (communication et argumentation)

10-5- Démarche utilisée :

La démarche utilisée comporte cinq étapes.

- **Définir le microorganisme à étudier** : Ce choix doit être fait en fonction du type de l'aliment considéré. *Listeria monocytogenes*, semble souvent bien indiquée quel que soit le produit. Pour le fromage c'est le Staphylocoque. Pour la viande c'est *Pseudomonas*.
Il faut ensuite déterminer les niveaux de contamination habituels(N0) et la concentration maximale qui peut être autorisée vis à vis du consommateur, et aussi tenir compte des paramètres qui sont susceptibles d'entraîner l'évolution de la population de ce microorganisme (Température, pH, Aw...).On détermine alors, pour les paramètres les valeurs minimales et maximale de développement.
- **Expérimentation** : Réaliser plusieurs cultures du microorganisme dans un milieu le plus proche de l'aliment. On fait varier les paramètres choisis d'un essai à l'autre ce qui permet d'obtenir les valeurs de la phase de latence et de μ_{max} dans différentes conditions.

- **Modélisation** : A partir des résultats expérimentaux et des modèles les plus couramment utilisés, on calcule expérimentalement les valeurs des paramètres du modèle.
- **Validation des modèles** : ce qui permet de prédire le comportement du microorganisme dans le produit dans différentes conditions. On réalise donc de nouvelles cultures pour lesquelles on calcule les paramètres expérimentaux et on compare avec l'utilisation du modèle.
 - On vérifie que les écarts entre les valeurs théoriques prévues par le modèle et les données obtenues dans les conditions qui ont servi à le construire ne sont pas excessifs,
 - On vérifie que les valeurs théoriques prévues par le modèle et les valeurs réelles obtenues sur le produit industriel contaminé naturellement ne sont pas excessifs
- **Prédiction** : on utilise les modèles pour prévoir l'évolution du microorganisme concerné et déterminer le temps nécessaire pour qu'il arrive à une concentration critique. Ces résultats peuvent contribuer à la détermination de la date limite de consommation (DLC) et des conditions de conservation des produits.

10-6 Modélisation de la croissance bactérienne

Modéliser la croissance consiste à décrire sous forme mathématique, les phases de latence, de croissance et de saturation (stationnaire) en y intégrant des variations des paramètres techniques et biologiques.

Les paramètres courants : μ_{\max} , $\lambda(\text{lag})$, x_0 , x_{\max} et le temps t ,

Deux types d'approche en modélisation :

Empirique : l'équation générée n'a aucune signification biologique.

Mécanistes : permettent d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques

La plupart des modèles sont semi-mécanistes : relation mathématique empirique mais les composantes de la formule sont des paramètres ayant une signification biologique.

La croissance d'une population bactérienne est parfaitement reproductible dans des conditions environnementales similaires

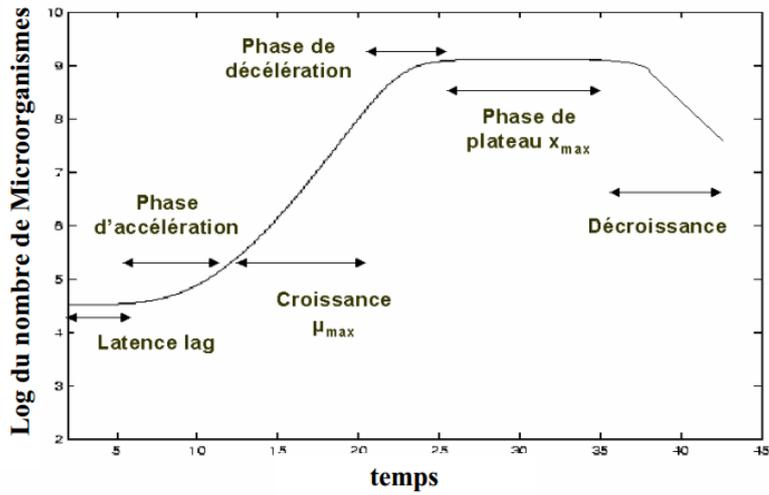


Figure 38 : Différentes phases de la croissance bactérienne

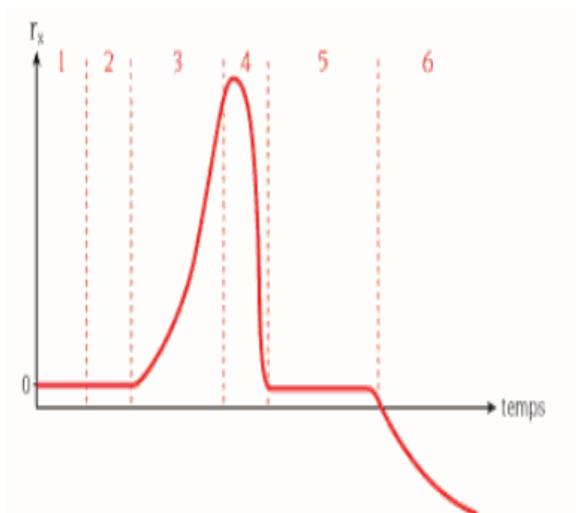


Figure 39 : Evolution de la vitesse de croissance

10-6-1 -Modèle de croissance exponentielle

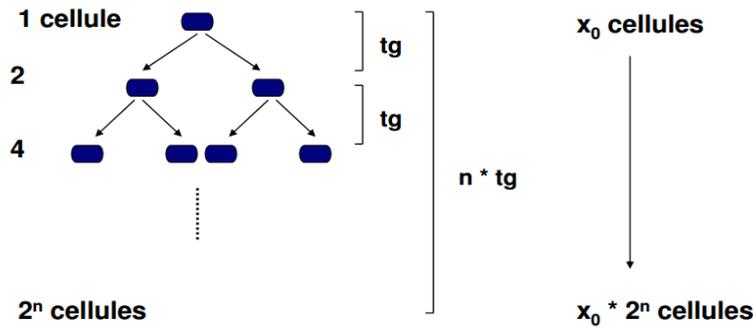


Figure 4 :Modèle de croissance exponentielle

La vitesse spécifique de croissance (taux de croissance):

$$\mu = n/t \quad \text{et} \quad g=t/n$$

$$\mu=n/t \quad n=\mu t$$

$$x_1=2x_0 \quad x_2=2x_0 \cdot 2 \quad x=x_0 2^n \quad x= x_0 2^{\mu t}$$

$$\text{Log} x = n \log 2 \quad \log x_0 = \mu t \log 2 \log x_0$$

$$\mu = \log x / t \log 2 \log x_0 \quad \log x / x_0 = \mu t / 2,3$$

$$\mu_{\max} = dx / x dt$$

10-6- 2 Modèle de croissance exponentielle intégrant la phase de latence

Ce modèle ajuste bien la phase de croissance exponentielle mais ne tient pas compte des autres phases.

D'autres modèles permettent de généraliser le modèle exponentiel en intégrant les phases de croissance stationnaire et les transitions entre les différentes phases de croissance.

La généralisation du modèle exponentiel peut être faite de la façon suivante :

$$dx / x dt = \mu_{\max} \cdot \alpha(t) \cdot f(x)$$

Où $\alpha(t)$ est une fonction décrivant le taux de croissance durant la phase de latence et $f(x)$ est une fonction de freinage aboutissant à la phase stationnaire.

Avec si $t = 0, x = x_0$ et si $t \geq 0 \quad x_{\max} \geq x \geq x_0 > 0$

10-6- 3 Niveaux de modélisation

- Niveau primaire : évolution du nombre de microorganismes en fonction du temps
- Niveau secondaire : effet des facteurs environnementaux sur les paramètres du modèle primaire
- Niveau tertiaire : modèle utilisant des systèmes experts et des bases de données pour faire un lien entre les modèles primaires et secondaires.

Modèle primaire

Consiste à décrire la cinétique de l'évolution de la population microbienne en fonction du temps. Divers modèles de croissance :

-empiriques ou basés sur des hypothèses biologiques divers.

-ajustant correctement les données

-permettant d'estimer μ_{max} et λ (lag) si les données sont suffisantes.

Le 1^{er} modèle utilisé en microbiologie prévisionnelle est le modèle exponentiel (Buchanan 1918):

Simple mais ne décrit pas les phases de latence et stationnaire

estimation pessimiste du nombre de bactéries(vitesse maximale)

Une alternative au modèle exponentiel est le modèle linéaire à trois phases proposé par Buchanan et al en 1997.

$$\ln[N(t)] = \begin{cases} \ln(N_0) & \text{si } t \leq \lambda \\ \ln(N_0) + \mu(t-\lambda) & \text{si } t > \lambda \\ \ln(N_{max}) & \text{si } N(t) \geq N_{max} \end{cases}$$

$N(t)$ nombre de cellules au temps t .

Les modèles primaires de croissance les plus utilisés actuellement sont:

- ✓ Modèle de Gompertz
- ✓ Modèle de baranyi(1993)
- ✓ Modèle de Rosso (1996)

Ces modèles sont de forme :

$$\ln x(t) = f(t, \Theta_1) + \epsilon_t$$

$X(t)$: concentration microbienne à l'instant t , f est la fonction de régression, Θ_1 (paramètres de croissance : $X_0, X_{max}, \lambda, \mu_{max}$), ϵ_1 est l'erreur associée à l'observation $\ln x(t)$.

- ✓ **Modèle de Compertz**

Basé sur des hypothèses biologiques.

Ajuste correctement les données.

Mais surestime μ_{\max} . et non directement utilisables en conditions dynamiques.

✓ **Modèle de Rosso :**

Modèle logistique avec délai et rupture:

Suppose qu'il n'y a pas de possibilité de croissance lors de la phase de latence et qu'il n'y a pas de transition entre la phase de latence et la phase exponentielle

$$f(t, \theta_1) = \begin{cases} \ln x_0 & , t \leq \text{lag} \\ \ln x_{\max} - \ln \left(1 + \left(\frac{x_{\max}}{x_0} - 1 \right) \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot (t - \text{lag})) \right) & , t > \text{lag} \end{cases}$$

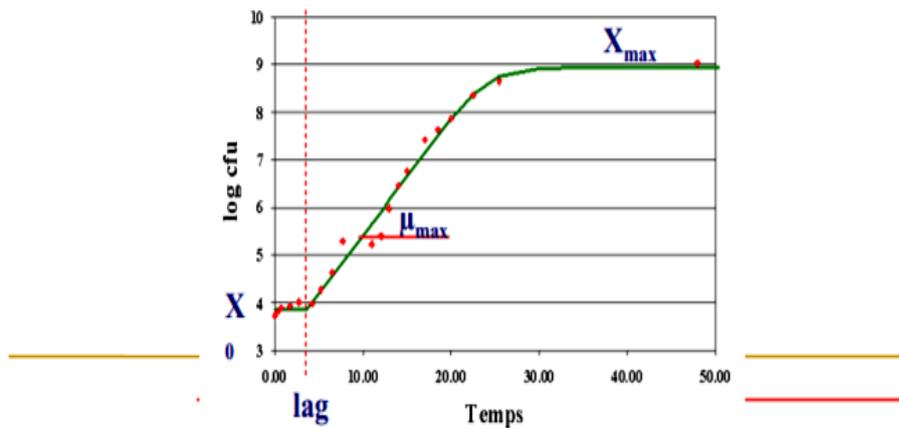


Figure 40 : Ajustement à un modèle de croissance -modèle logistique avec délai et rupture (Rosso,1996)

✓ **Modèle de Baranyi(1993)**

Basé sur une équation différentielle (phase exponentielle) et complété par deux fonctions d'ajustement :

1^{ère} fonction : décrit la phase d'accélération

2^{ème} fonction : décrit la phase de ralentissement

Courbes de croissance, fonctions mécanistiques d'ajustement

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

(Frein)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_\infty} \right)$$

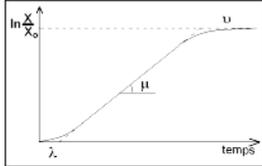
$$X = \frac{X_\infty}{1 + \left(\frac{X_\infty}{X_0} - 1 \right) e^{-\mu t}}$$

Ce modèle ne tient pas compte de la phase de latence

(Accélérateur)

Modèle de
Baranyi 1993

$$\frac{dX}{dt} = \alpha(t) \mu X \left(1 - \frac{X}{X_\infty} \right) \quad \alpha_n t = \frac{P_0 e^{\mu_{\max} t}}{K_0 + P_0 e^{\mu_{\max} t}}$$



$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left(1 + \frac{\exp(\mu_{\max} A(t)) - 1}{\frac{X_{\max}}{X_0}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(\exp(-vt) + \exp(-h_0) - \exp(-vt - h_0))$$

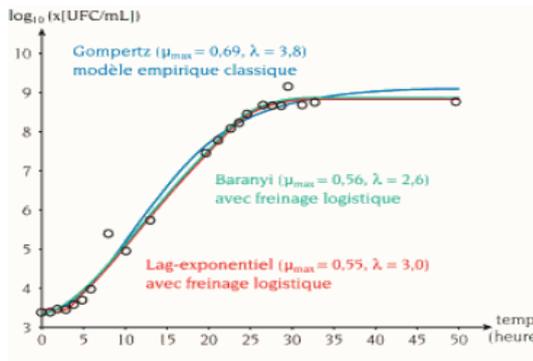


Figure 41 : Les trois principaux modèles de croissance

✓ Autres modèles primaires

- La plupart des modèles actuels s'intéressent au comportement d'une population bactérienne.
- D'autres s'intéressent au comportement de cellules individuelles et se basent sur différents principes :
 - Consommation d'une substance vitale pour la croissance
 - L'augmentation de la biomasse
 - Apparition de molécules précédant la division
 - hétérogénéité entre les cellules composant une population en phase de latence.

Les modèles secondaires

Décrivent les paramètres du modèle primaire en fonction des principaux facteurs environnementaux.

Deux types d'approches :

- Modulation par ajustement de surface de réponse : prise en compte simultanée des facteurs.
- Approche progressive ou modulaire : prise en compte des facteurs un à un (ne prend pas en compte l'interaction entre les facteurs)

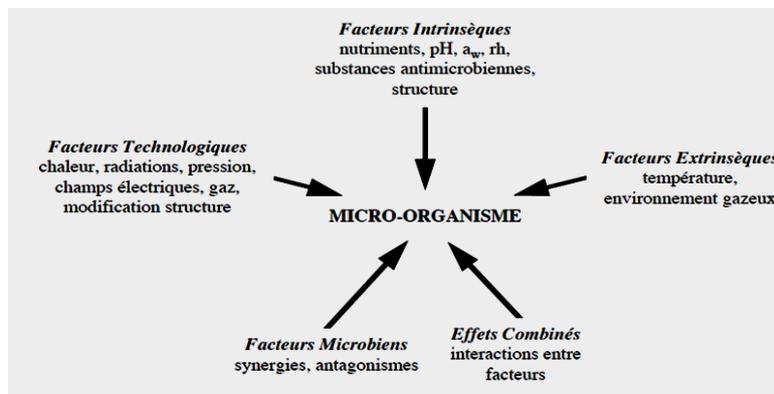


Figure 42 : Facteurs environnementaux agissant sur le comportement des microorganismes dans les aliments.

Plusieurs modèles : Modèle gamma, Modèle cardinal, Modèle racine carrée

➤ **Le modèle γ**

Utilisé par zwietering et al. en 1992.

Introduit un facteur de croissance sans dimension.

$$\gamma(x) = \frac{\mu(x)}{\mu_{max}}$$

Effets inhibiteurs multiplicatifs :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \gamma(T) \gamma(pH) \gamma(a_w)$$

$$\gamma(T) = \left[\frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} \right]^2$$

$$\gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{min})(pH_{max} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{min})(pH_{max} - pH_{opt})}$$

$$\gamma(a_w) = \frac{a_w - a_{wmin}}{1 - a_{wmin}}$$

➤ **Modèle secondaire : Modèle cardinal**

-Modèles empiriques

-Un paramètre cardinal a une signification biologique.

-Même principe que le modèle γ

- l'influence de chaque effet environnemental peut être intégré dans une fonction par des facteurs multiplicatifs.

Modèle cardinal

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} CM_n(X)$$

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max})(X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1} [(X_{\text{opt}} - X_{\min})(X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\max})((n-1)X_{\text{opt}} + X_{\min} - nX)]} & X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0, & X \geq X_{\max} \end{cases}$$

CM acronyme du modèle cardinal

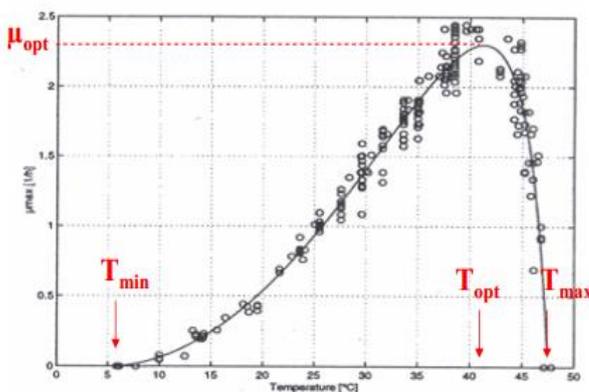
X facteur environnemental

Xmin Xopt ,X max, valeurs cardinales de croissance

n paramètre de forme .

modèle CTMI(cardinal température model with inflection) Rosso 1993 :

Impact de la température sur le taux de croissance μ_{\max} :



Valeurs cardinales :

$$T_{\min} - T_{\text{opt}} - T_{\max}$$

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \gamma_T$$

Taux de croissance de *E. coli* en fonction de la température

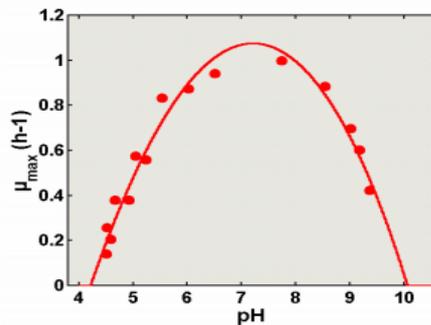
$$\text{Rosso, 1995 } \gamma_T = \frac{(T - T_{\min})^2 (T - T_{\max})}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}) [(T_{\text{opt}} - T_{\min})(T - T_{\text{opt}}) - (T_{\text{opt}} - T_{\max})(T_{\text{opt}} + T_{\min} - 2T)]}$$

Modèle cardinal Rosso et al 1995

Prend en compte le facteur pH

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \gamma_{\text{pH}} \quad 0 < \gamma_{\text{pH}} < 1$$

$$\gamma(\text{pH}) = \frac{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH} - \text{pH}_{\max})}{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH} - \text{pH}_{\max}) - (\text{pH} - \text{pH}_{\text{opt}})^2}$$



Effect of pH on the growth rate of *L. innocua*

Autres facteurs :

Paramètres caractéristiques de la croissance :

Paramètres propres au Micro-organismes	{	Température :	- Minimale (T_{\min}) - Optimale (T_{opt}) - Maximale (T_{\max})	}	γ_T			
		{	pH :			- Minimal (pH_{\min}) - Optimal (pH_{opt}) Maximal (pH_{\max})	}	γ_{pH}
			{			A_w :		
	{	Inhibiteur : (acide organique)		- Concentration minimale inhibitrice (CMI) - Paramètre de forme (a)	}	γ_{AH}		

+ prise en compte de l'aliment : Paramètre unique μ_{opt}

Modèle CTPM

Modèle tenant en compte de l'effet matrice.

$$\mu_{\max} = \underline{\mu}_{\text{opt}} \gamma(T) \gamma(\text{pH})$$

Prise en compte de l'effet de la matrice alimentaire:

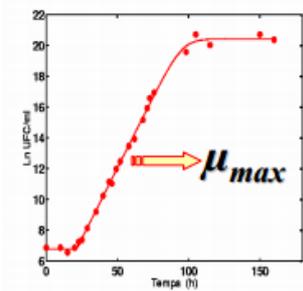
Deux aliments ayant les mêmes caractéristiques T° , pH, a_w , AH ne vont pas forcément induire le même développement microbien.

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \gamma_T \cdot \gamma_{\text{pH}} \cdot \gamma_{a_w} \cdot \gamma_{\text{AH}} \cdot \gamma_{\text{int}}$$

Une multitude de facteurs va intervenir sur la croissance d'un microorganisme, les facteurs ayant un effet majoritaire sont pris en compte dans les modèles γ . Tous les facteurs qui ne sont pas modélisés sont intégrés dans le μ_{opt} caractéristique de la matrice alimentaire.

La détermination de μ_{opt} nécessite une cinétique de croissance sur cet aliment (Challenge test) puis déterminer le taux de croissance dans les conditions données.

✓ **Courbes de référence :**



$$\mu_{opt} = \frac{\mu_{max}}{\gamma_T \cdot \gamma_{pH} \cdot \gamma_{aw} \cdot \gamma_{AH} \cdot \gamma_{int}}$$

✓ **Modèles secondaire :**

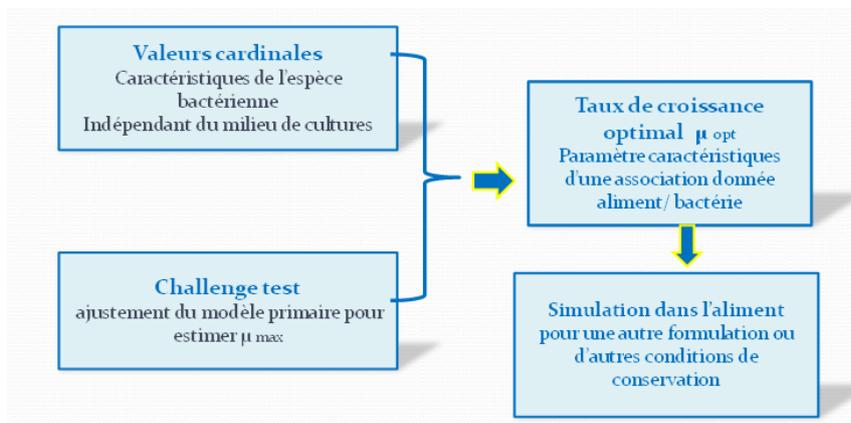
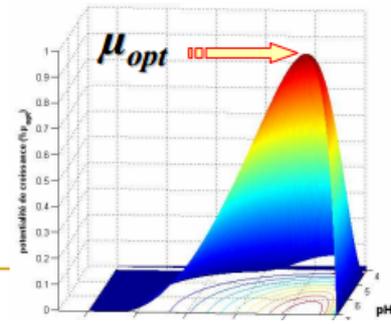


Figure 43 : Simulation de la croissance bactérienne en tenant compte de la matrice alimentaire selon les modèles Sym'previus .

Modèle CTPM :

Modèle tenant compte de la température du pH et de la matrice alimentaire.

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \gamma(T) \gamma(pH)$$

➤ **Modèle square root**(racine carrée) :

Présenté par Ratowsky et al. en 1983 .Purement empirique

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{min})$$

.T < T_{min} , T << T_{opt} , b coefficient de régression ajusté pour des valeurs de température inférieures à T_{opt} , T température en °C

➤ **Modèles polynomiaux**

Appelés également modèles « bulldozers »

Mettent en interaction plusieurs facteurs environnementaux.

$$\mu = ax + by + cz + dx^2 + efy^2 + \dots + fz^n$$

(x, y, ..., z :facteurs environnementaux ;a, b ,c....permettent au modèle de s'ajuster au mieux aux données)

-Aisés à calculer

-Prévisions acceptables dans les domaines où ils ont été établis

Défauts:

- nombre de paramètres élevé (a,b,c.....)
- paramètres sans signification biologique
- modèles peu robustes

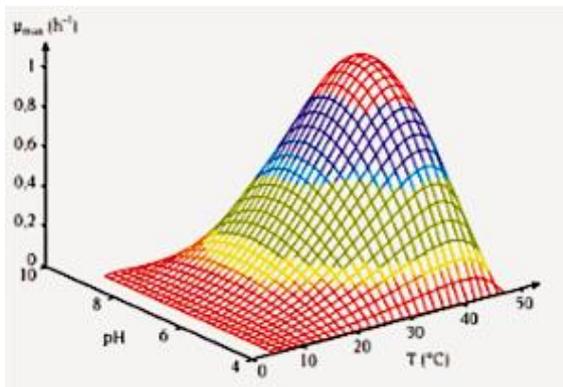


Figure 44 : Exemple de visualisation du modèle polynomial global

➤ Modélisation du temps de latence

La durée de latence : temps nécessaire pour qu'une bactérie s'adapte à son environnement (processus biochimiques, de biosynthèses ou encore l'activation de gènes) .

Le temps de latence dépend de l'environnement actuel, mais aussi de l'environnement précédent et de l'état physiologique des bactéries.

Le développement de modèles secondaires pour prédire le temps de latence est compliqué.

Deux approches ont été adoptées pour modéliser le temps de latence :

-la première considère que le temps de latence et la vitesse de croissance doivent être modélisés séparément (Ratkowsky et al., 1982),

la deuxième considère que le temps de latence est proportionnel au temps de génération des bactéries car celles-ci doivent réaliser une certaine quantité de travail pour s'adapter à leur nouvel environnement

D'après Delignette-Muller (1998), le temps de latence λ serait inversement proportionnel au taux de croissance μ lorsque les conditions de pré-incubation sont constantes. Ceci permet d'introduire le produit $\mu \cdot \lambda$ avec :

$$\lambda \cdot \mu = K \quad (K = \text{constante})$$

$$\lambda \cdot \mu_{\max} = K$$

lorsque le taux de croissance est optimal, le temps de latence est minimal :

$$\lambda_{\min} \cdot \mu_{\text{opt}} = K$$

d'où $\lambda_{\min} \cdot \mu_{\text{opt}} = \lambda \cdot \mu_{\max}$ et

$$\lambda = \lambda_{\min} \cdot \mu_{\text{opt}} / \mu_{\max}$$

$$\lambda = \lambda_{\min} / CM(T) \cdot CM(\text{pH}) \cdot CM(a_w)$$

Modèles tertiaires :

Modèles utilisant des systèmes experts, des bases de données et des outils de simulation. Différents logiciels sont disponibles sur internet :

-Les bases de données contiennent des cinétiques de croissance, de décroissance ou de destruction thermique obtenues sur des aliments pour les principaux microorganismes pathogènes.

-les outils de simulation facilitent l'utilisation des modèles primaires et secondaires et permettent de prédire la croissance des microorganismes dans les aliments en fonction de différents facteurs (T° , pH, a_w ...)

-un système expert est un logiciel capable de répondre à des questions, en effectuant un raisonnement à partir de faits et de règles connus. Il peut servir notamment comme outil d'aide à la décision.

Logiciels de microbiologie prévisionnelle :

La systématisation de cette modélisation a permis aux fournisseurs de logiciels de simulation de faciliter la modélisation aux utilisateurs. Plusieurs logiciels sont disponibles sur le web parmi lesquels on trouve le comBase ,le sym' previus ect.

Le tableau I donne la liste de quelques sites webs proposant des outils informatiques utiles en microbiologie prévisionnelle.

Tableau XII : sites web proposant des outils informatiques utiles en microbiologie prévisionnelle.

ComBase	<p>www.combase.cc</p> <p>ComBase est une base de données sur la croissance, la survie ou l'inactivation des micro-organismes dans les aliments. Les données ont été obtenues à partir de la littérature ou fournies par le soutien de plusieurs institutions. La boîte à outils de modélisation au sein de ComBase comprend ComBase Predictor, Perfringens predictor et DMFit. ComBase Predictor comprend un ensemble de modèles de croissance ou d'inactivation pour de nombreux micro-organismes pathogènes ou d'altération d'origine alimentaire en fonction de facteurs environnementaux, y compris la température, le pH et la concentration de sel. Perfringens Predictor est une application pour prédire la réponse de <i>Clostridium perfringens</i> dans la viande au cours du refroidissement où la température maximale de cuisson est entre 70 et 95 °C. DMFit est une application permettant d'ajuster un modèle primaire de croissance ou d'inactivation sur des données obtenues lors d'expérimentations afin d'obtenir le temps de latence, la vitesse de croissance ou de décroissance, la concentration initiale et maximale</p>
FSLP	<p><i>Fish Shelf Life Prediction Program</i></p> <p>http://ccm.ytally.com/fileadmin/user_upload/downloads/2_FSLP_Cold_Chain_2008_Alfaro_01.pdf</p> <p>FSLP permet la prédiction et la visualisation de l'acceptabilité sensorielle et de la croissance des bactéries altérantes sur des produits de l'aquaculture suivant différentes conditions de stockage</p>
Foodrisk.org	<p>www.foodrisk.org</p> <p>Le site propose des informations relatives à l'analyse des risques, y compris des données, des tutoriels, des outils et des liens. Quelques informations sur la microbiologie prévisionnelle sont également disponibles. Le site s'intéresse principalement aux travaux réalisés en Amérique du Nord</p>
GInaFIT	<p>http://cit.kuleuven.be/biotec/downloads.php</p> <p>GInaFit est un outil simple d'utilisation à utiliser avec Microsoft Excel. Il permet l'ajustement de neuf modèles différents de survie microbienne sur des données expérimentales relatives à l'évolution de la population microbienne au cours du temps</p>
Opti-Form [®] Listeria control	<p>http://www.purac.com/EN/Food/ingredients/Meat_poultry_and_fish/Preservation/Food-safety/Listeria.aspx</p> <p>Ce logiciel commercial prédit l'effet des acides organiques, la température, le pH et l'humidité sur la croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les produits de viande</p>
PMP	<p><i>Pathogen Modeling Program</i></p> <p>http://portal.arserrc.gov</p> <p>Ce logiciel permet de prédire la croissance ou l'inactivation des bactéries pathogènes suivant les conditions de température, de pH, de NaCl, d'activité d'eau et dans certains cas, la concentration en acides organiques. En outre, PMP comprend des modèles permettant de prédire l'effet du refroidissement à partir de profils de température sur la croissance de <i>Clostridium botulinum</i> et <i>Clostridium perfringens</i> après la cuisson de produits de viande de bœuf. Il existe une version du logiciel téléchargeable et une version accessible en ligne</p>
Process Lethality Determination spreadsheet	<p>http://www.amif.org/ht/d/sp/i/26870/pid/26870</p> <p>Le but du modèle est de fournir aux transformateurs de viande un outil de validation scientifique pour démontrer l'efficacité d'un traitement thermique spécifique. Le modèle permet de saisir les données de temps/température à partir d'un cycle de cuisson pour déterminer si le procédé permet la réduction souhaitée du nombre de micro-organismes</p>
Refrigeration index calculator	<p>http://www.foodsafetycentre.com.au/refrigerationindex.php</p> <p>L'index de réfrigération prédit la croissance d'<i>Escherichia coli</i> dans la viande en fonction de la température du pH, de l'activité de l'eau et de la concentration en lactate. Le modèle permet d'entrer des données de température au cours du temps. Les autres paramètres sont fixés par type de produit. Le logiciel est disponible au téléchargement</p>

10-7 Validation des modèles

Les modèles obtenus doivent avoir été validés dans un domaine d'utilisation spécifique.

Une telle validation passe nécessairement par des expérimentations dans l'aliment étudié (challenge test) avec confrontation aux prévisions du modèle, avant de pouvoir utiliser le modèle pour des simulations en conditions inédites. Valider des modèles c'est s'assurer que le modèle est applicable en situation réelle pour des denrées alimentaires. Il faut faire une :

- ✓ **validation mathématique**: vérifier que les écarts entre les valeurs théoriques prévues par la modèle et les données obtenues ne sont pas excessifs (test de vieillissement).
- ✓ **Validation dans les produits** : vérifier que les valeurs prévues par le modèle et les valeurs réelles obtenues sur des produits industriels contaminés (challenge test) ne sont pas excessifs.

Le Challenge Test est un protocole microbiologique dont l'objectif est de déterminer si le produit alimentaire est susceptible de permettre ou non la croissance d'une bactérie pathogène, telle que *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella*. Il s'applique aussi à d'autres microorganismes responsables d'altération : bactéries, levures ou moisissures.

Le Challenge Test consiste à contaminer volontairement une denrée alimentaire par un microorganisme cible, dans des conditions bien définies, et d'en quantifier l'évolution dans le temps.

Validation des modèles de croissance par challenge- test

10-8 Limitation de la microbiologie prévisionnelle

Méthode très restrictive et pénalisante pour le fabricant car les paramètres réellement observés sont très inférieurs aux prévisions.

Ceci s'explique par le fait que les mesures sont réalisées dans des systèmes simplifiés ne tenant pas compte de :

- ✓ L'effet structure qui limite le transfert de matière.
- ✓ La compétition entre flore banale et les pathogènes dont on cherche à modéliser la croissance.
- ✓ La variabilité inter-souches.
- ✓ L'histoire antérieure des microorganismes contaminants.
- ✓ Le très faible nombre, en particulier des spores, dont la probabilité de germination est faible, et variable.

10-9- Applications de la microbiologie prévisionnelles :

- les plans HACCP (*Hazard Analysis - Critical Control Point* ou Analyse des risques pour la maîtrise des points critiques).

- l'Appréciation Quantitative de Risque (AQR) :
- la détermination de la durée de vie d'un aliment
- Le développement d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé
- la mise au point d'une nouvelle formulation d'un produit sur l'évolution des micro-organismes ;
- la planification des expériences.

Tableau XIII : Applications de la microbiologie prévisionnelle

HACCP	<ul style="list-style-type: none"> -Analyse de risques -Identification et établissement des points critiques -Actions correctives -Evaluation de l'importance des interactions entre les variables
Evaluation des risques	<ul style="list-style-type: none"> -estimation de l'évolution du nombre de micro-organismes dans une chaîne de production, -évaluation de l'exposition à une bactérie pathogène, -conséquences de cette exposition
Détermination de la durée de vie d'un aliment	<ul style="list-style-type: none"> -Prédiction de la croissance des microorganismes d'altération ou pathogène dans un aliment.
le développement d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé	<ul style="list-style-type: none"> -Effet de la transformation des aliments sur leur innocuité et leur altération -l'évaluation d'une nouvelle technologie de production
Température et hygiène	<ul style="list-style-type: none"> Rôle de la chaîne du froid dans la préservation de la salubrité et la qualité des aliments.
la planification expériences	<ul style="list-style-type: none"> Définition des intervalles entre chaque échantillonnage et nombre d'échantillons à prélever.

10-9-1 Méthode HACCP

Analyse des dangers pour la maîtrise des risques.

Risque = danger éventuel plus ou moins prévisible

Danger = ce qui compromet ou menace la sûreté (Agent biologique, chimique ou physique présent dans une denrée alimentaire pouvant entraîner un effet néfaste sur la santé).

Le système HACCP vise à contrôler la fabrication depuis l'achat de la matière première jusqu'à la consommation du produit.

Le système HACCP comprend :

- **L'analyse des risques** : identification et évaluation de leur gravité.
- **Détermination des points critiques (CCP pour critical control points)**

Matière première, entreposage, et transport

- **Fixer le ou les seuils critiques ou limites de tolérance** : physique , chimique et biologiques
- **Mise en place de procédure de surveillance**
- **Rédaction d'un document**
- **Application de procédure de vérification**
- **Prendre des mesures correctives lorsque les critères ne sont pas atteints**

La démarche HACCP (concernant l'aspect microbiologique) vise à : Maitriser les facteurs de l'environnement susceptibles de favoriser la contamination d'un produit par les microorganismes, leur multiplication ou leur destruction.

La microbiologie prévisionnelle peut :

- ✓ Rendre la démarche HACCP plus efficace en prévoyant l'évolution des microflores dans le produit, ainsi que les risques de dépasser les seuils de tolérance pour les différentes catégories de micro-organismes.
- ✓ Elle permet de diminuer le rôle des analyses qui présentent des difficultés liées aux problèmes statistiques posés par l'échantillonnage.

10-9-2 Détermination de la durée de vie microbiologique d'un aliment :

a -Définition :

La durée de vie d'un aliment est définie comme la période durant laquelle un produit répond à des spécifications en termes de sécurité (innocuité) et de salubrité (absence d'altération), dans les conditions prévues de stockage et d'utilisation, y compris par le consommateur. La durée de vie détermine la date de durabilité, exprimée par une DLC ou une DLUO.

DLC = date limite de consommation

À consommer jusqu'au :jour/mois

S'applique aux denrées alimentaires, microbiologiquement, très périssables (voir tableau III)

DLUO= date limite d'utilisation optimale

À consommer de préférence avant le jour mois année.

Date jusqu'à laquelle le produit conserve l'ensemble de ses qualités organoleptiques(aspect , goût ,texture ,couleur...)

Tableau XIV ; Classes d'aliments selon leur sensibilité au développement microbien

Classe	pH	Activité de l'eau	Température de conservation
Très périssable	> 5,2	> 0,95	≤ 5 °C
Périssable	Entre 5 et 5,2		≤ 10 °C
		Entre 0,90 et 0,95	≤ 10 °C
Stable	≤ 5	≤ 0,94	Pas de réfrigération
	< 5		Pas de réfrigération
		< 0,94	Pas de réfrigération
Très stable	< 4,5*		Pas de réfrigération
		< 0,90	Pas de réfrigération
	< 5	< 0,94	Pas de réfrigération

* Ce pH est valable lorsque l'acidification est obtenue par un acide organique (acétique ou lactique) ; sinon il doit être inférieur à 4,2.

b- Facteurs influençant la durée de vie d'un produit

La durée de vie dépend de:

*La formulation : conservateurs, pH ,Aw ...

* la transformation industrielle : Cuisson, barème temps/ température, refroidissement

* Conditions de conservations : Température, UV

* Conditionnement : matériaux, atmosphère de conservation

c- Etapes de la détermination de la DLC:

➤ Estimer l'évolution des microorganismes d'altération ou /et pathogènes

- | | | |
|----------------------------------|---|---|
| ✓ Test de croissance bactérienne | } | - bonne description du comportement |
| ✓ Challenge test | | - délais important de réponse et coût élevé |
| ✓ Microbiologie prévisionnelle | | |

Exemples de microorganismes pathogènes et d'altération

-Les espèces pathogènes :

Escherichia coli 0157H, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella*, *Enterobacter sakazakii*, etc...

-Les espèces d'altération :

Lactococcus, Lactobacillus, Bacillus psychrotrophes, Bacillus thermorésistants, Serratia, Citrobacter, Pseudomonas, Shewanella, Levures, Moisissures, Etc...

-Les microorganismes indicateurs d'hygiène, de pathogènes ou de qualité des procédés industriels :

Entérobactéries, coliformes, Staphylocoques, anaérobies sulfite-réducteurs, bactéries lactiques, levures et moisissures, etc ...

- **Fixer la durée de vie et les conditions de conservation** (avec marge de sécurité hétérogénéité et maîtrise de la chaîne du froid).

- **Valider la durée de vie.**

Il faut prendre en considération les caractéristiques organoleptiques.

d -Démarche générale pour le calcul d'une date limite :

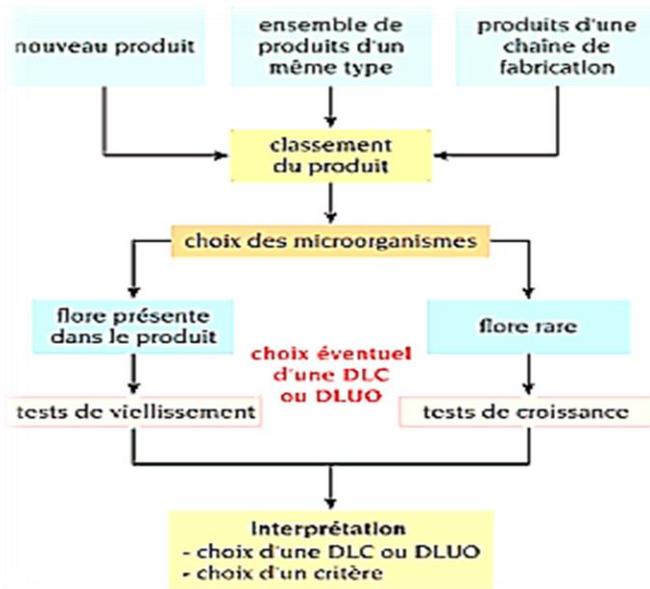
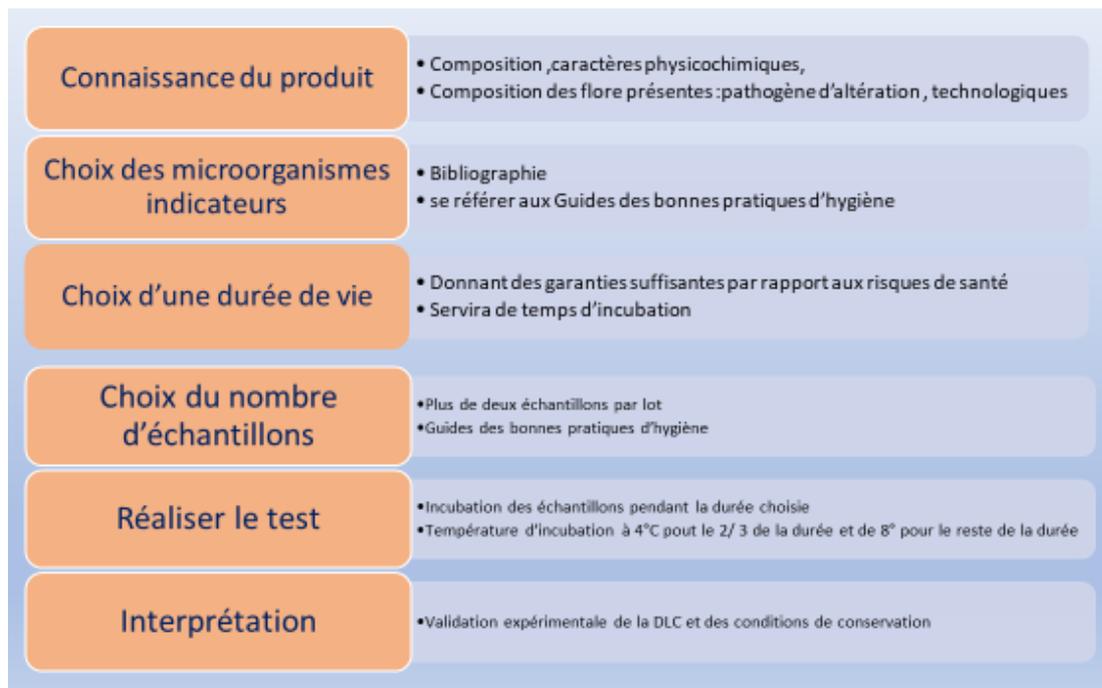


Figure 45 : Démarche générale pour le calcul d'une date limite (Branger.A et al. 2007)

Protocole générale de la réalisation d'un test de durée de vie :



✓ Définition du produit

Composition : analyse, tables de composition et bibliographie

Caractéristiques physicochimiques : analyses et bibliographie

Composition des flores présentes (altération, pathogènes, technologiques): analyse et bibliographie

Tenir compte de l'hétérogénéité du produit, de son utilisation et des variations possibles de la chaîne du froid.

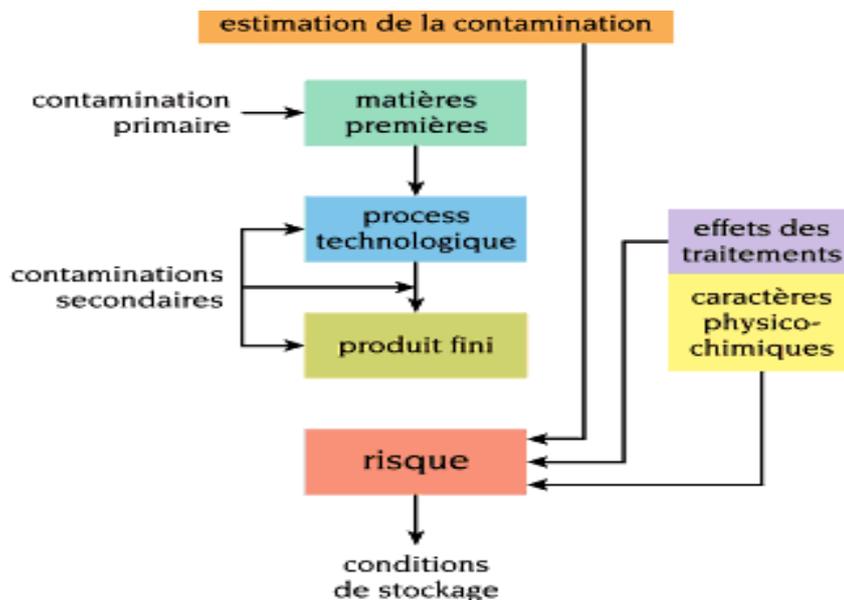
Il est dans tous les cas utile d'exploiter l'ensemble des informations disponibles, en particulier concernant :

- la description détaillée du produit, notamment ses caractéristiques physico-chimiques,
- la description détaillée du procédé (transformation, conditionnement, stockage),
- les données de la littérature scientifique,
- les données historiques d'autocontrôles (y compris des tests de vieillissement).

✓ Raisonnement du risque d'un produit

Risque : peut se définir par la **probabilité de survenue de l'effet indésirable** sur la santé (maladie particulière, mort, hospitalisation, etc.) après exposition à l'aliment contaminé.

Selon les produits en raisonnant à partir de leurs contamination primaire ou secondaire, des traitements technologiques qu'ils ont subis, de leurs caractéristiques physicochimiques on peut prévoir les risques qu'ils peuvent faire courir au niveau de la consommation.



Échantillons (trois répétitions par échantillon)		Premier type d'incubation	Deuxième type d'incubation
A	1	2/3 à T1, 1/3 à T2	1/3 à T1, 2/3 à T2
	2		
	3		
B	1	2/3 à T1, 1/3 à T2	1/3 à T1, 2/3 à T2
	2		
	3		
C	1	2/3 à T1, 1/3 à T2	1/3 à T1, 2/3 à T2
	2		
	3		

Figure 46 : Schéma général de l'étude du niveau de risque d'un produit

(Branger .A et al.2007)

✓ **Protocoles**

a) Tests de vieillissement

Les **tests de vieillissement** consistent à proposer une **DLC** pour son produit. Le laboratoire conserve le produit jusqu'à cette DLC puis réalise l'analyse microbiologique du produit.

Ils sont utilisés pour les denrées périssables. Ils permettent d'évaluer la croissance des bactéries dans les aliments naturellement contaminés, conservés dans des conditions raisonnablement prévisibles.

Ils peuvent être mis en œuvre dans le cadre de la validation ou de la vérification de la maîtrise de la qualité microbiologique en fin de durée de vie microbiologique.

Réalisation du test :

Elle se fait selon le protocole donné par le tableau IV.

- 3 échantillons (A,B,C) par lot
- Incubation pour la durée choisie.
- La température d'incubation varie en fonction du temps :

T1 température de conservation fixée par la réglementation ou par le fabricant.

$T_2 > T_1$ T2 est représentative d'une rupture probable de la chaîne de froid.

Tableau XV : Protocole générale de la réalisation d'un test de durée de vie

(Branger.A et al. 2007)

1er type d'incubation : chaîne de froid est complètement ou partiellement maîtrisée

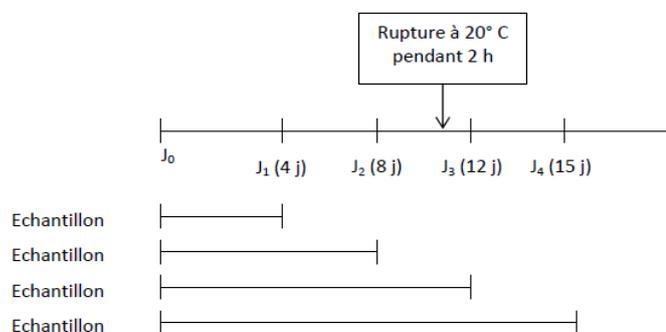
2ème type d'incubation : Chaîne de froid n'est pas suffisamment connue ou maîtrisée

$T_2 = 8^\circ\text{C}$ si $0 < T_1 < 4^\circ$

Les analyses sont réalisées à des temps différents.

Exemple de Protocole pour une durée de vie de 15 jours.

Si les tests sont utilisés pour déterminer la durée de vie, il est conseillé de soumettre les produits à une rupture de la chaîne du froid (20°C pendant 2 heures pour simuler l'achat)



Les conditions de conservation (température et durée) des produits sont celles décrites précédemment ($1/3$ à 2°C soit 6 jours et le reste à 8°C).

La durée entre les prélèvements dépend de la durée de vie totale (exemple ci-dessus pour un DV = 15 jours)

Interprétation des résultats

Elle se fait en fonction des seuils spécifiques à chaque microorganisme par type de produit. (Liste de critère en cours d'élaboration par l'AFSSA)

Tableau XVI : Valeurs guide pour déterminer la qualité des aliments prêt à être consommés

Test	Satisfaisant	Marginal	Non satisfaisant	Potentiellement Dangereux
<i>Enterobacteriaceae</i> (a)	$<10^4$	$10^2 - 10^4$	$\geq 10^4$	
<i>Escherichia coli</i>	<3	3-100	≥ 100	(b)
<i>Staphylococcus coagulase +</i>	$<10^2$	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Colostridium perfringens</i>	$<10^2$	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Bacillus cereus</i> et autres <i>Bacillus spp</i> pathogènes	$<10^2$	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Vibrio parakaemolytica</i> (c)	<3	3- 10^2	$10^2 - 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Campylobacter spp</i>	Non détectée dans 25g			Détectée
<i>Salmonella spp</i>	Non détectée dans 25g			Détectée
<i>Listeria monocytogenes</i>	Non détectée dans 25g	Détectée mais $<10^2$ (d)		$\geq 10^2$

Le test est fait par dénombrement sur boîte de Petri. Les valeurs sont exprimées en UFC.

(a)Le test pour Enterobactériaceae n'est pas applicable pour les fruits et les légumes frais,

(b)Les E.coli pathogènes doivent être absents

(c)V.parahaemolyticus doivent être absents des produits de mer cuits

(d)Pour les aliments à longue durée de vie conservés à basse température listeria monocytogenes doit être absente dans 25 g .

b) Tests de vieillissement accéléré :

Le vieillissement accéléré consiste à placer un aliment dans des conditions telles que son vieillissement est accéléré par rapport à un vieillissement en conditions ambiantes. L'intérêt principal est d'observer l'évolution au cours du temps pour estimer une date limite d'utilisation optimale sans attendre la durée réelle proposée. Par exemple : Mimer un an de vieillissement en quatre mois.

Le facteur température est utilisé pour accélérer les réactions d'oxydation. L'ambiance est humide ou sèche selon la sensibilité du produit à l'humidité (ex: biscuits)

Limites : pour certains produits, des modifications qui n'auraient pas lieu à température ambiante peuvent se produire à température élevée (réactions de Maillard, modification de texture, ...)

c) Les tests de croissance ou challenge test

Le challenge test est une technique expérimentale qui consiste à inoculer, dans un produit, une concentration connue d'un microorganisme, et de suivre le développement de celui-ci par des dénombrements effectués à différentes échéances.

➤ Buts

Confirmer que les propriétés physico-chimiques de l'aliment (PH, activité d'eau) et/ou son conditionnement (atmosphère modifiée) rendent la multiplication du micro-organisme concerné impossible.

Dans le cas où l'aliment permet un développement du micro-organisme, de déterminer une valeur de tolérance à la sortie de production.

➤ Intérêt

Réaliser un challenge test sur un produit permet d'apporter les bénéfices suivants :

- Gestion du risque pathogène : classer les produits vis-à-vis du risque de croissance des pathogènes
- Démarche HACCP : évaluation des risques et détermination des points critiques dans le cadre de la démarche HACCP
- Réglementaire : transformer le critère « Absence en 25g » en « présence <100 à la DLC »
- Economique : éviter ou limiter les retraits de produits en cas de contamination par un pathogène

➤ Applications

Exemples d'applications :

- Estimation du potentiel de croissance d'un microorganisme pathogène ou d'altération
- Détermination du temps de latence et du taux maximum de croissance (données pour la microbiologie prévisionnelle)
- Calcul de la concentration initiale tolérée pour *L. monocytogenes* afin de pouvoir respecter le seuil de 100 ufc/g à DLC
- Détermination du taux de destruction bactérienne d'une formulation ou d'un procédé industriel

➤ Protocole pour réaliser un challenge test :

- Choix des souches : Souches isolée à partir d'un produit alimentaire de même type et Souches provenant de collections.
- Préparation de l'inoculum : utilisation de bouillon adapté à la croissance du microorganisme et incubation à la température optimale de la croissance.
- inoculation : Inoculum prélevé pendant la phase stationnaire, inoculation en profondeur et en surface (Contamination) ou en surface (post contamination)
- Conditions d'incubation : Température favorisant la multiplication du microorganisme ou température de conservation habituelle.
- Analyses : Méthodes normalisées, analyses classiques ou génétiques
- Interprétation : Seuils inscrits dans les textes réglementaires

11 -Le stress bactérien et la sécurité des aliments

Définition

Le stress Microbien est un état physiologique dans le quel se trouve la bactérie soumise à un changement d'environnement.

La bactérie est vivante mais a subie des lésions temporaires qui peuvent toucher les enveloppes cellulaires, L'ADN ou l'ARN, les ribosomes, les enzymes.

Remises dans les conditions naturelles les cellules peuvent se réparer et revenir à l'état normal (wester et al 2009).

Dans les aliments et leur environnement de fabrication, les microorganismes sont soumis à divers facteurs stressants.

Trois types de facteurs stressants :

- Physique : traitement thermique, pression, ultrason, lumière pulsée
- Chimique : sel, sucre, acides organiques, conservateurs
- Nutritionnelle : carence en eau, en phosphate ou en azote.

Face à ces stress les bactéries développent des systèmes adaptatifs comme :

- Une limitation métabolique propice à la survie.
- La sporulation.
- Cellules viables non cultivables.

Selon l'intensité du stress la réponse est différente.

Pour un stress faible : il y a ralentissement de la croissance (état sub-létal). Les cellules sont viables et actives seulement sur milieu non sélectif. Ce stress provoque une réponse adaptative s'accompagnant souvent d'une tolérance induite au stress.

Pour un stress modéré : les cellules sont lésées, non actives, non cultivables, viables (VNC)

Pour un facteur de stress sévère : cellules non cultivables, non actives et non viables (figure 47)

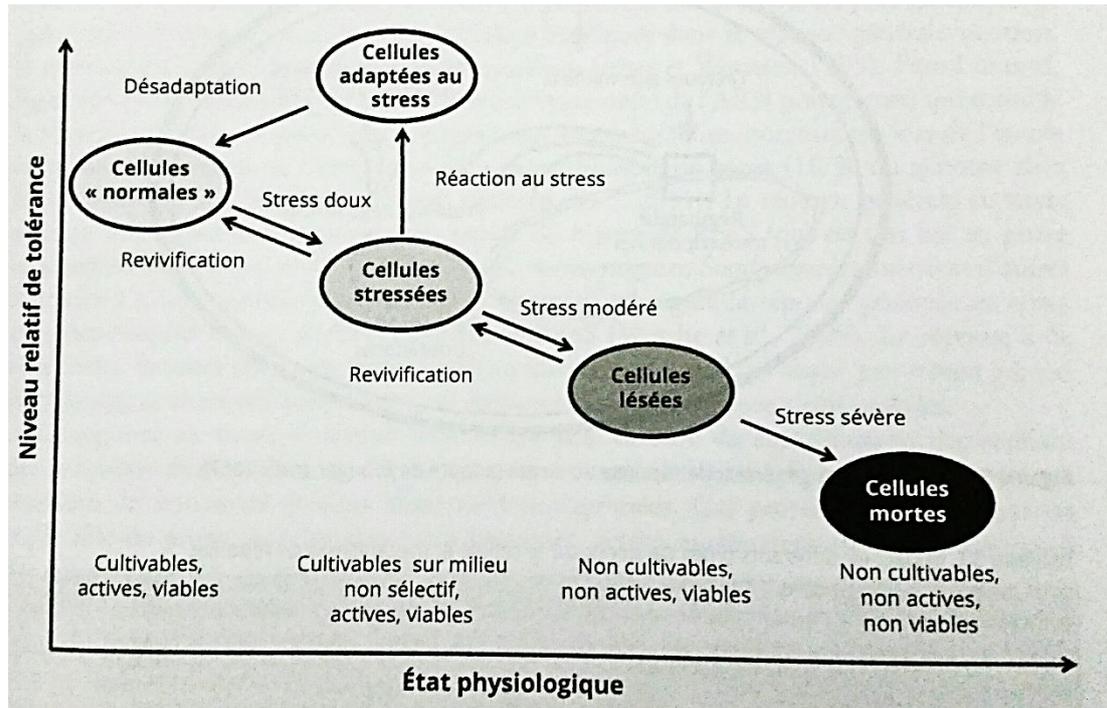


Figure 47: Etats physiologiques des cellules stressées et niveau relatif de tolérance correspondant. (Naitali M, et al 2017)

Mécanismes généraux de réaction au stress

Les réponses au stress visent à réparer les lésions et à rétablir l'homéostasie, à survivre et à s'adapter à la croissance dans les nouvelles conditions.

Malgré la diversité des facteurs stressants et de leurs cibles cellulaires, il existe chez les bactéries un mécanisme commun de régulation face au stress. C'est un mécanisme à deux composantes.

- **Un capteur** permettant à la cellule de percevoir le stress (généralement une histidine kinase)
- **Un régulateur** transcriptionnel permettant de répondre.

Dès que le stress est perçu un mécanisme général implique une modification des facteurs sigma. Les facteurs sigma ont pour rôle de sélectionner les sites de fixation de l'ADN polymérase et d'induire l'expression de régulateurs particuliers impliqués dans la production de protéines régulatrices qui induisent une modification du métabolisme ou qui génèrent des mutations dans le chromosome (Figure 48)

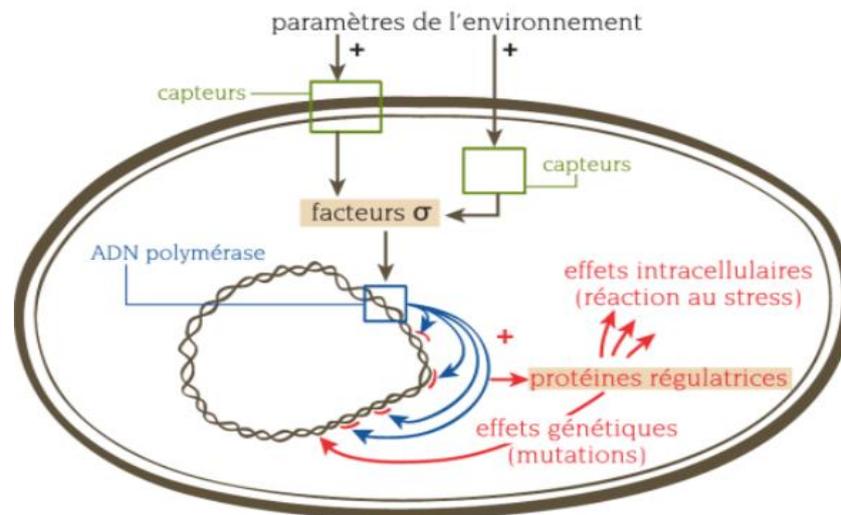


Figure 48 ; Mécanismes généraux de réponse au stress.(Brange.A et al 2007)

Tableau XVII : Impacte de différents types de stress et mécanismes de réponse.
(Naitali M,et al 2017)

Stress	Impact sur la cellule	Mécanismes de réponse au stress
Tous	Altération des enveloppes cellulaires, des protéines et des acides nucléiques	Système de régulation à deux composantes, facteur σ alternatif, protéines de stress, ARN non codants, réponse SOS (enzymes de réparation de l'ADN), modifications membranaires
Thermique	Modification de la vitesse des réactions enzymatiques, dénaturation des protéines et inhibition de la synthèse, modification de la fluidité membranaire	Synthèse de protéines de choc thermique chaud ou froid, accumulation d'osmoprotecteurs, adaptation de la fluidité membranaire par modification de la synthèse des phospholipides
Oxydatif	Oxydation des lipides membranaires, oxydation des protéines, mutation de l'ADN	Synthèse de protéines de choc oxydatif, enzymes d'élimination de l'agent (catalase, peroxydases), enzymes de réparation de l'ADN
Acide	Saturation des perméases membranaires, chute du pH intracellulaire, vitesse des réactions enzymatiques, dénaturation de l'ADN et des protéines	Système d'efflux de protons (transporteurs membranaires. Synthèse de protéines de choc acide, enzymes de décarboxylation des acides aminés, enzymes réparatrices de l'ADN, augmentation des acides gras membranaires
Osmotique	Plasmolyse, vitesse des réaction enzymatiques, déshydratation de la cellule	Synthèse de protéines de choc osmotiques, accumulation ou synthèse d'osmoprotecteurs .

La réponse au stress induit une cascade de signalisations qui conduit à la synthèse de protéines de stress qui agissent par :

- Protection des structures (enzymes, acides nucléiques).
- Réparation et dégradation des structures endommagées.
- Élimination du facteur stressant notamment si c'est une molécule chimique.

Conséquences du stress bactérien :

Le stress bactérien conduit à :

- L'induction de la tolérance qui est une diminution transitoire de la sensibilité bactérienne.
- Problème de détectabilité des cellules stressées par les techniques de routine et par la non cultivabilité des cellules sur milieux sélectifs
- La formation de filaments probablement par arrêt de division cellulaire pour économiser l'énergie
- Modification de la virulence ; augmentation de la virulence et du pouvoir invasif.
- Génération d'une hétérogénéité cellulaire par mutagenèse adaptative

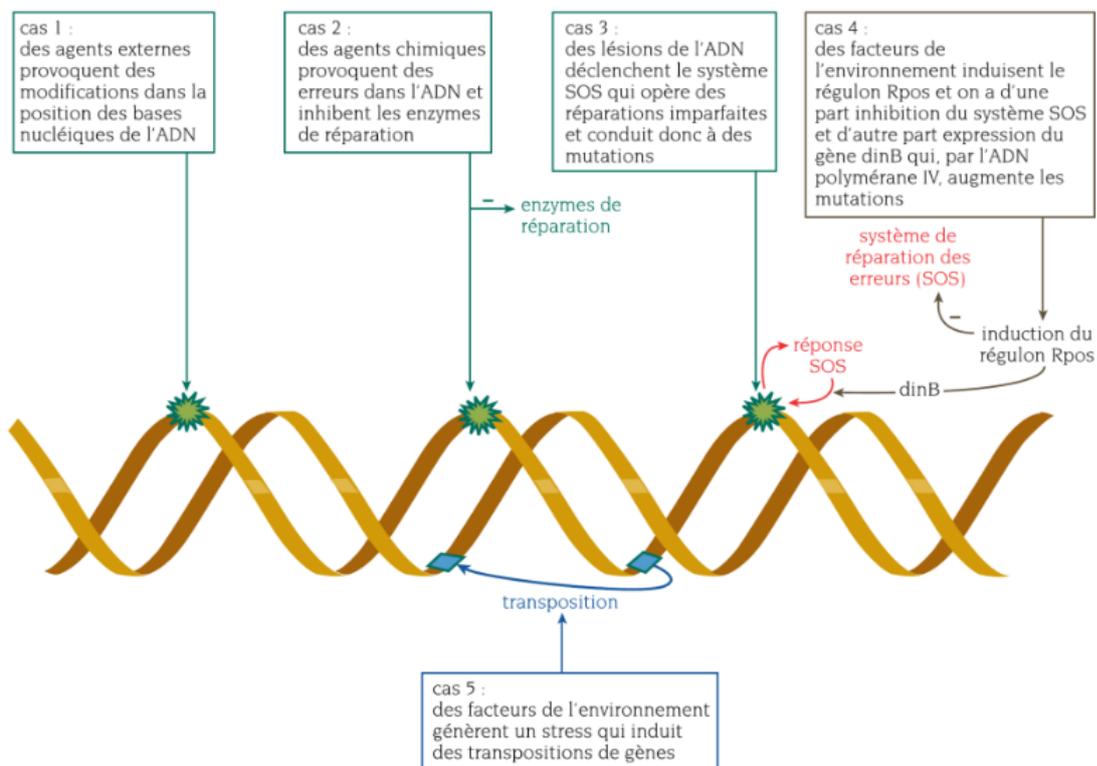


Figure 49 : Réponse mutationnelle au stress chez les bactéries

Stress Thermique :

A des températures sub-optimales, les bactéries produisent les protéines de stress ou choc :

HSP (heat shock protein) : agissent en tant que protéines chaperonnes permettant le repliement correct des protéines réparables et la destruction des protéines dénaturées. Elles jouent un rôle dans le métabolisme énergétique dans la réparation et la réplication de l'ADN, la synthèse de la paroi cellulaire. Chez E. coli il y a plus d'une cinquantaine de HSP

CSP (cold shock protein) : jouent un rôle primordial dans la transcription, la traduction, le repliement des protéines et des ARN messagers, l'assimilation des sucres.

CAP (Cold acclimation protein) : adaptation de la fluidité membranaire par modification de la synthèse des phospholipides.

Stress acide :

Que ce soit dans les aliments, dans le système gastro-intestinal ou dans les phagosomes les bactéries subissent souvent un stress acide. En réponse au stress acide les bactéries développent des modifications génétiques et physiologiques qu'on regroupe sous le terme ATR (Acid Tolerance Response). La cellule produit par l'intermédiaire d'un facteur sigma, des décarboxylases qui entraînent la suppression de groupements acides carboxyliques. Ce sont des lysines, glutamate et arginines décarboxylases. Dans le même temps des protéines de réparations sont synthétisées ASP (acid choc protéine)

Stress osmotique

Lorsque la pression osmotique extérieure de la cellule augmente. Il y a une perte de turgescence et la cellule va par l'activation de protéines spécifiques accumuler des substances (Osmoprotecteurs) lui permettant de restaurer sa pression osmotique interne.

Ces osmoprotecteurs sont très variés, on rencontre la bétaïne, la carnitine, le tréhalose, le glycérol, le saccharose, la proline.

Stress oxydatif et chimique :

Il est causé par les désinfectants oxydant et par les macrophages (peroxyde d'hydrogène ou les ions superoxydes).

La bactérie stressée produit les protéines de stress oxydatif qui agissent par :

- élimination de l'agent stressant (catalases, superoxyde dismutase)
- réparation des macromolécules lésées (exonucléases, glycosylases)

Stress nutritionnel

Face à un stress nutritionnel, une reprogrammation génétique et physiologique, appelée réponse au stress nutritionnel (SSR, Starvation-Stress Response). Certaines protéines de stress nutritionnelles sont spécifiques à une carence particulière, mais la plupart sont communes à de nombreux stress.

Les germes stressés et la sécurité des aliments :

Certains stress conduisent au renforcement de la résistance des microorganismes aux traitements technologiques. Ainsi un traitement thermique sub-létal induit une résistance par la production de protéine de choc thermique et par sélection de clones thermorésistants.

Le vieillissement des cultures sur des milieux pauvres en nutriments (plans de travail insuffisamment nettoyés) entraîne un stress privatif qui augmentera la résistance des bactéries au traitement thermique et aux désinfectants.

Les cellules stressées par des désinfectants, par la chaleur ou par la privation semblent développer une aptitude particulière à constituer des biofilms à la surface du matériel utilisé en agroalimentaire.

Bibliographie

- Agbor.T Egbe, A. Brauman, D. Griffon, S. Trèche . 1995 **Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc**. Éditions ORST
- Antão E-M, Lothar H W and Ewers C. 2009, **Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli Gut Pathogens**. 1:22
- Branger.A, Richer.M.M, Roustel.S.2007.**Microbiochimie et alimentation**. Edition educagri.
- Capozzi. V.Fiocco D, Maria Luisa Amodio , Anna Gallone and Giuseppe Spano 2009. **Bacterial Stressors in Minimally Processed Food Int. J. Mol. Sci.** 10, 3076-3105
- Dehalle.L, Dause. G, Adolphe.Y, Creve cœur.S, Clinquart.A., 2012. **Les modèles de la croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments**.biotechnol.Agron.soc.environ.Vol 16 .N° 3:369-381
- Demers.B, Sansonetti.P, **Mécanismes moléculaires des diarrhées bactériennes**. Médecine thérapeutique, 1997, 34(3)15-25
- Fahurddin.MD,Reaz mohammad, Mazumderand khanjada Shahnewaj ben mannan ,2011.**Predictive microbiology:Moduling microbial responses in food**.Ceylon Journal of science(bio.science) **40 (2) :121-131**
- Fessard,A.;Remize,F.2017. **Lactic Fermentation as an Efficient Tool to Enhance the Antioxidant Activity of Tropical Fruit Juices and andTeas**.Microorganisms , 5(2), 23; <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020023>
- Fiocco.D , Maria Luisa Amodio , Anna Gallone and Giuseppe Spano , **Bacterial Stressors in Minimally Processed Food Int. J. Mol. Sci.** 2009, 10, 3076-3105
- Gunnar N. Schroeder and Hubert Hilbi. **Molecular Pathogenesis of Shigella sp: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion**. Clin. Microbiol. Rev. January 2008 21:134-156
- James P. Nataro and James B. Kaper. **Diarrheagenic Escherichia coli**. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11(1):142.
- Leyral G;Elisabeth vierling.2000 . **Microbiologie et toxicologie des aliments**. Doin
- NAÏTALI. M, GUILLIER L, DUBOIS-BRISSONNET F. 2017. **Risques microbiologiques**. Lavoisier
- Prescott, Harly Klein. 2007.**Microbiologie**. De Boeck.
- SANSONETTI F. 2002. **Aspects modernes de la guerre des bactéries**. Gastroenterol Clin Biol;26: B24-B31

Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. 2016. **Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages** *Frontiers in microbiology* 7, 377, <http://www.gutpathogens.com/content/1/1/22>

Thiagarajah J.R and Verkman A.S, 2005. **New Drug Targets for Cholera Toxin**, *Pharmacol Sci.* 26 PP. 172-5,

Vincent CARLIER .1997, **Le stress bactérien et ses applications en microbiologie des aliments**. *Bull. Acad. Vét. de France*, 70, 355-362