



**Université Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc**

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

- I - Les relations microorganismes / aliments / consommateurs**
- II - Les maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments**
- III - Les agents antimicrobiens**

Professeur Jean-Louis CUQ

Département

Sciences et Technologies des Industries Alimentaires

4^{ème} année

I - LES RELATIONS ALIMENTS - MICROORGANISMES - CONSOMMATEURS

I - INTRODUCTION

Un des effets les mieux connus des microorganismes contaminants de nos aliments est la dégradation de la qualité.

Cette qualité de nos produits alimentaires peut, au plan microbiologique, être définie de 2 façons :

I - 1. La qualité marchande concerne essentiellement les caractéristiques organoleptiques et se traduit par un attrait ou une répugnance par les consommateurs. Ses incidences économiques sont déterminantes pour l'industrie alimentaire. Les caractéristiques nutritionnelles et technologiques de l'aliment contribuent à cette qualité.

Tous nos aliments peuvent être le siège de prolifération microbienne, prolifération d'autant plus variée que le produit est "riche" en éléments nutritifs et placé dans des conditions favorables à la croissance microbienne. Ainsi la plupart de nos aliments (non soumis à des traitements antimicrobiens) ont des charges microbiennes comprises entre 10^4 et 10^6 /g. Au cours de cette prolifération des modifications d'aspect (couleur, limon), de texture, de flaveur (odeur et saveur) apparaissent. Les microorganismes les plus souvent rencontrés appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Clostridium sporogenes* et *Flavobacterium*, et les modifications qu'ils engendrent sont le plus souvent défavorables (odeur putride, limon, rancissement, liquéfaction etc...). Parfois cette prolifération est souhaitée (bière, vin, yaourt, beurre, fromage, saucisson, choucroute, anchois, nuoc-nam etc...) : il s'agit alors de fermentations contrôlées, de biotransformations, de production de biomasse.

I - 2. La qualité hygiénique.

L'innocuité d'un aliment correspond à une qualité seuil et la norme zéro défaut doit être atteinte pour certains systèmes aliment-microorganisme en particulier à partir du moment où la présence du microorganisme dans le produit risque d'avoir une incidence défavorable et parfois très grave sur la santé du consommateur.

Il n'en reste pas moins vrai qu'actuellement les maladies microbiennes d'origine alimentaire sont des affections à la "mode" dont chacun d'entre nous peut être la victime. Généralement les symptômes ressentis sont qualifiés de "crise de foie" et ont une localisation gastro-intestinale.

L'évolution du mode de vie caractérisé par un passage de la cuisine familiale à la restauration collective, un recours à des aliments préparés à l'avance hors du domicile, l'apparition de produits nouveaux (100 aliments en 1900, plus de 10 000 en 1999, combinaisons de constituants de matières premières) ont entraîné une augmentation des risques. Les "accidents" affectent souvent un nombre élevé d'individus et sont amplifiés et souvent mal commentés par les médias.

Toutefois, tendre vers la consommation d'aliments stériles est probablement très défavorable pour l'humain qui deviendrait plus sensible aux maladies s'il n'est pas continuellement en contact avec un certain nombre de germes pathogènes. En effet ces germes induisent et stimulent des mécanismes de défense. Ainsi quand des européens ou des américains "voyagent" hors de leurs frontières, ils contractent des maladies pour lesquelles les populations des pays visités sont immunisées (**tourista**).

Dans son approche actuelle, la microbiologie alimentaire apparaît au premier abord comme une démarche simpliste. En effet, vérifier la conformité à des critères microbiologiques par l'étude de groupes mal définis au plan taxonomique comme la flore aérobie mésophile, les coliformes, les anaérobies sulfito-

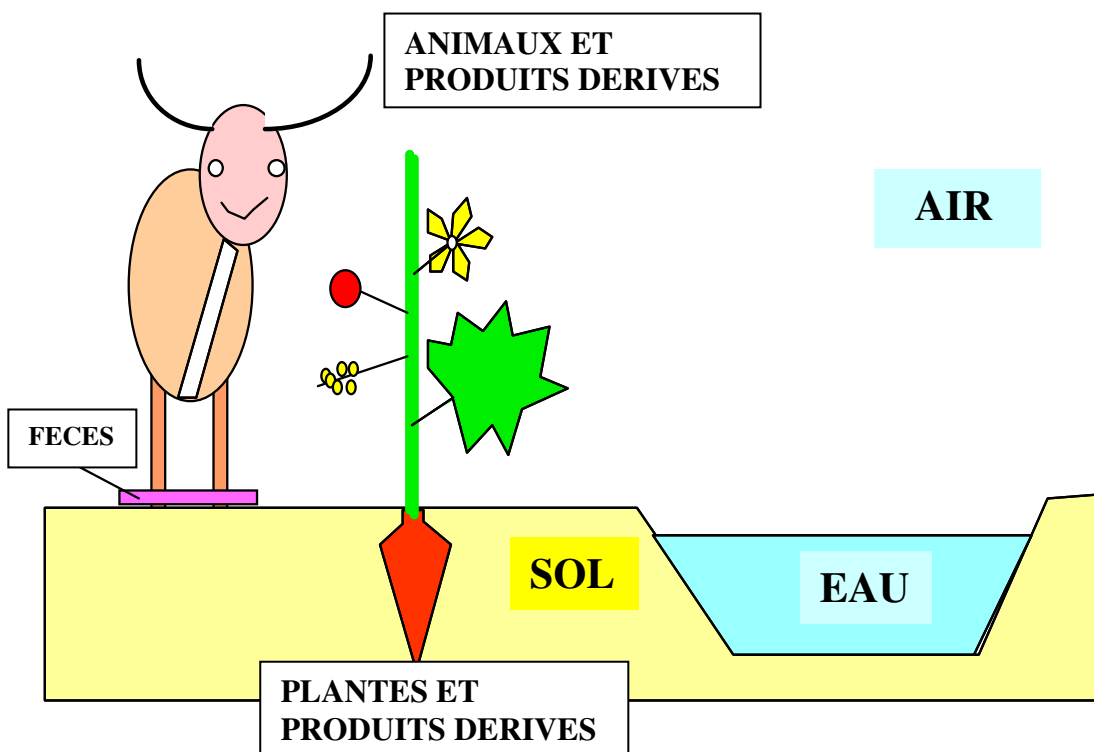
réducteurs est une opération apparemment facile à effectuer. Or, il n'en est rien car il est nécessaire que ces techniques soient codifiables, standardisables (universalité), peu coûteuses, rapides et sensibles quand il s'agira de rechercher un petit nombre de germes "noyés" dans un environnement bactérien abondant.

Les maladies liées à la consommation d'aliments coûtent cher aux états (soins - arrêt de travail) qui ont, pour la plupart, développé des systèmes de protection des consommateurs (inspection, contrôle et normes). Ainsi depuis 1992, des normes européennes sont mises en place pour prévenir de telles maladies. Malgré cela, il semble que depuis 1940 le nombre de ces maladies n'ait pas diminué. Si ce contrôle peut localiser un "problème", il est évident que c'est la "gestion" d'un produit qui le préviendra (qualité des matières premières et de leur environnement, éducation des employés de l'industrie, de la distribution, des restaurateurs, des "cuisiniers domestiques", etc...).

II - ROLE ET SIGNIFICATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

Les aliments sont d'origine végétale et/ou animale: la flore normalement associée aux plantes et aux animaux est donc potentiellement présente. De plus, un apport microbien exogène est souvent inévitable (environnement, contact, manipulations, etc...).

II - 1. Sources primaires de microorganismes



II - 1 - 1. Sol et eau

bactéries : *Achromabacter*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sarcina*, *Streptomyces*, etc..

moisissures : *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Bothrytis*, *Fusarium* etc...

levures : *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Torula* etc. souvent associées aux plantes donc dans le sol.

II - 1 - 2. Plantes et produits dérivés

Le sol et l'eau sont les sources primaires des microorganismes des plantes (cf. ci-dessus) avec en plus des flores spécifiques :

bactéries : *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Paracolobactrum*, etc.

moisissures : genres responsables de dégradations des fruits et végétaux

levures : *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Torula*, etc...

II - 1 - 3. Animaux et produits dérivés

Le tractus intestinal de l'homme ou des animaux contient jusqu'à 10^{11} germes par g (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... Les moisissures ne sont pas transmises par foie fécale. A partir du tractus digestif ces microorganismes se retrouvent souvent dans les eaux et le sol à partir desquels ils contaminent les plantes. Rappelons que la charge microbienne totale d'un homme sain est voisine de 10^{17} à 10^{19} .

La flore microbienne de la peau des animaux ou de la peau des manipulateurs (mains surtout) est fonction de l'environnement (sol, poussière, air, eau etc.) et de l'"hygiène". Les charges microbiennes atteignent facilement des valeurs comprises entre 10^4 et 10^6 par cm^2 .

Gaffkya, *Sarcina*, *Staphylococcus* sont des hôtes fréquents de la main, du nez et de la bouche. Les cheveux sont de véritables "filtres à air" et leur flore dominante est donc celle de l'air et des poussières. Si les conditions d'hygiène sont mal respectées, des microorganismes d'origine intestinale sont susceptibles d'être introduits dans nos aliments. La contamination des vêtements et ustensiles est fonction de l'environnement et des modes de contact.

II - 1 - 4. Air et poussière

La plupart des bactéries et des moisissures et de très nombreuses levures y sont présentes.

Bactéries : *Bacillus*, *Sarcina*, *Micrococcus* sont fréquentes car résistantes aux basses HR **Moisissures** : *Torulopsis*, etc.

II - 1 - 5. Produits fermentés

Le développement contrôlé d'un ou plusieurs microorganismes dans une matière première donnée d'origine animale (lait, viande) ou végétale (choux, jus de fruit) permet d'obtenir des produits dont les propriétés physico-chimiques sont modifiées (texture, goût, couleur, odeur, pH, etc).

De nombreux produits traditionnels sont obtenus après fermentation, la charge microbienne résiduelle étant très grande (lait fermenté) ou relativement faible (boissons fermentées).

Produits traditionnels: laits fermentés, fromages, charcuterie, choucroute, boissons fermentées

Bactéries : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Acetobacter*

Levures : *Saccharomyces* et **moisissures** : *Penicillium*, *Aspergillus* dans les phénomènes de succession de flores.

II - 1 - 6. Microorganismes aliments

Il s'agit de microorganismes cultivés le plus souvent sur des substrats issus de l'industrie pétro-chimique (*Candida*, *Pseudomonas*, *Spirulina*, etc.).

Rappelons que *Saccharomyces cerevisiae* est communément consommé sous forme séchée.

II - 2. Altérations microbiennes des aliments

II - 2 - 1. Contamination “naturelle” suivie soit de la mort, de la survie ou de la prolifération des germes.

La charge microbienne “normale” de la plupart de nos aliments est de l'ordre de $10^4/g$.

Il y a **mort** quand les microorganismes ne trouvent pas dans l'aliment les conditions nécessaires à leur croissance (composition, conditions d'entreposage, traitements antimicrobiens..).

La **survie** des microorganismes est liée à des conditions n'engendrant pas la mort mais ne permettant pas la multiplication (composition, froid ...).

Il y a prolifération quand les microorganismes trouvent les conditions nécessaires à leur croissance. Dans ce cas généralement défavorable il y a altération de la qualité marchande si les germes sont saprophytes et altération de la qualité sanitaire (et parfois marchande) si les germes sont “pathogènes”.

Dans la nature, les proliférations microbiennes par succession de flores ont pour finalité de minéraliser complètement le produit (dans le cas de microorganismes hétérotrophes).

La notion de charge microbienne en relation avec la qualité du produit est fonction de la nature du produit et de la nature du germe présent.

II - 2 - 2. Incidences sur la qualité marchande (modifications des qualités organoleptiques)

La prolifération de microorganismes dans un produit alimentaire se traduit par des modifications des qualités organoleptiques généralement détectables quand le nombre de germes dépasse les 10^6 par g de produit. Les modifications d'aspect (couleur, limon), de texture ou de flaveur (odeur et saveur) sont souvent défavorables : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Flavobacterium*, *Clostridium*.

Parfois cette prolifération engendre des modifications souhaitées (bière, vin, saucisson, beurre, fromages, yaourt, choucroute).

1) Relations microorganisme / composition de l'aliment

- A partir des **glucides de l'aliment (et dérivés)**
 - * polymères (amidon, cellulose) : hydrolyse : texture modifiée
 - * dimères et monomères (saccharose, maltose, lactose, glucose, fructose, etc) : fermentations : formation d'acides et de composés carbonylés par exemple : incidence sur le goût et l'arôme
- A partir des **protides de l'aliment (et dérivés)**
 - * polymères (protéines) : hydrolyse : texture modifiée
 - * acides aminés : décarboxylation, désamination, désulfuration etc. : modifications du goût, de l'odeur, formation de catabolites toxiques
- A partir des **lipides de l'aliment (et dérivés)** : oxydation et lipolyse (goût).

2) Modifications de l'odeur

Le développement de microorganismes dans un produit est d'abord détecté par des modifications d'odeurs en raison de la sensibilité de notre système olfactif. Le seuil de détection de composés organiques volatiles se situe en moyenne à 10^{-6} - 10^{-9} g (10^{-12} pour des dérivés de la pirazine).

Généralement, ces modifications sont biphasiques :

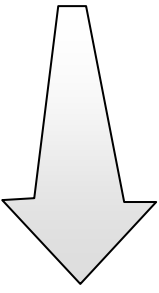
1) Une grande partie de l'aliment est transformée en un produit dominant (acide acétique - éthanol) : il peut s'agir d'une altération (aigre...) ou d'une transformation souhaitée.

Si le produit est riche en glucides et a un **pH > 6** il y a tendance à la **fermentation lactique**. Si le produit a un **pH < 6 et sans O_2** , tendance à la **fermentation alcoolique**.

Cette altération primaire est détectable à partir d'un seuil d'environ 10^8 germes / g.

2) Production d'odeurs caractéristiques liées à des composés organiques volatiles (odeur - goût) ou non (goût). Le seuil de détection de ces composés odorants varie de 10^{-6} à 10^{-12} g (dérivés de la pirazine).

Quelques exemples de seuils de perception

| | Odeur | µg/l |  |
|-------------------------------|---------|-------------------|---|
| 2-isobutyl, 3-méthoxypirazine | poivron | $2 \cdot 10^{-3}$ | |
| méthylmercaptan | café | $2 \cdot 10^{-2}$ | |
| 2,4-décadiénal | poulet | $7 \cdot 10^{-2}$ | |
| éthyl-2-méthyl butyrate | pomme | 10^{-1} | |
| 3-hexénal | tomate | $3 \cdot 10^{-1}$ | |
| γ-décalactone | pêche | $7 \cdot 10^{-1}$ | |
| acétate d'amyle | banane | 5 | |
| éthanol | | 10^5 | |

Ces composés contribuent à la qualité de certains produits fermentés (vins, fromages) ou à la dépréciation quand ces odeurs sont désagréables (odeurs de relent, d'ammoniac, de mercaptans, d'amines, etc...). Analysés par C.P.V. ces composés permettent parfois d'identifier les microorganismes qui les ont produits.

Les composés odorants produits par les microorganismes sont pour la plupart d'entre eux détectés quand la charge microbienne atteint 10^6 à 10^7 germes/g.

Il n'est généralement pas possible d'attribuer à chaque microorganisme la genèse d'une odeur particulière. Cette production est fonction de la composition d'aliment, de la température, de la souche etc.. Néanmoins les moisissures engendrent souvent une odeur de moisi (complexe) ou de rance tandis que les bactéries génèrent des odeurs agréables, fruitées ou désagréables.

Pseudomonas : odeur de tilleul (milieux pauvres en matières organiques)
Achromobacter ou *Flavobacterium* : odeur de pomme ou de navet (bière)
Bacillus subtilis : odeur de melon pourri
Streptomyces : odeur de moisi.

* viandes : un développement microbien en surface se traduit par une **odeur de relent** à partir de 10^7 germes/g quand l'entreposage est réalisé à **10°C** et d'une **odeur ammoniacale** et d' **H_2S** quand l'entreposage est réalisé à **température ambiante** : on parle alors de putréfaction qui est un phénomène parfois recherché (faisandage).

* poissons : la putréfaction génère des odeurs ammoniacales (formation de triméthylamine, de mercaptan, de diméthylsulfure, H_2S etc...). Chez le maquereau il existe par exemple 2 phases : la première correspond à la production d'acide lactique (aigre) et la deuxième à la genèse des odeurs ammoniacales.

* fromages : *Cl. butyricum* synthétise de l'acide butyrique à odeur désagréable caractéristique. Une odeur ammoniacale survient après protéolyse.

3) Modifications du goût

Elles sont liées à la présence de **composés volatils** ou **non**.

La plus fréquente correspond à une acidification liée à la production d'acide lactique. Divers qualificatifs sont utilisés pour décrire cette transformation : piquêr, aigrissement, sursissement... Cette modification est favorable avec certains produits (fromages, choucroute, saucisson) Dans le cas du vinaigre c'est l'acide acétique qui est produit.

Les **seuils de perception du goût** de certains composés sont indiqués dans le tableau ci-après:

| | |
|------------|---------------|
| NaCl | 0,25 % |
| Saccharose | 0,5 % |
| HCl | 0,007 % |
| quinine | 5.10^{-5} % |

Certains des goûts liés à la de quelques microorganismes sont décrits ci-après :

| | |
|------------------|---|
| Goût de noisette | : <i>Leuconostoc citrovorum</i> : diacétyl : beurre. Ce même microorganisme induit un goût de margarine dans les jus d'agrumes |
| Rancissement | : <i>Pseudomonas</i> |
| Goût de malt | : levures dans le lait |
| Goût caramélisé | : levures ou <i>Streptococcus lactis</i> var. maltigenes dans le lait |
| Goût alcoolisé | : levures |
| Goût douçâtre | : levures (production de mannitol) : vin |
| Goût crayeux | : levures (<i>Endomycopsis</i> ou <i>Trichosporum</i>) : pain |
| Goût amer | : <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> transforment le glycérol en acroléine qui se combine avec des polyphénols : bière. |
| Goût piquant | : production de CO ₂ |
| Goûts fruités | (biotransformations). |

4) Modifications de l'aspect et de la couleur

Ces modifications sont chronologiquement détectables visuellement bien après l'apparition d'odeurs. Dans une première phase il s'agit de petites zones qui présentent des caractéristiques variables quant à leur forme (rondes, plates, bombées, irrégulières...).

Leur **aspect** (opaque, mat, brillant, rugueux...) et/ou leur couleur (blanc, noir, jaune, rouge...) sont multiples. Ces zones sont constituées de bactéries, levures et de sécrétions muqueuses qui s'étendent à la surface de l'aliment et forment un revêtement souvent gluant, visqueux et poisseux : cette phase est qualifiée de **poissage**.

La prolifération de moisissures est caractérisée par la formation de zones colorées à évolution centrifuge. Ces zones peuvent présenter des aspects variés (feutrage, taches rugueuses...).

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

5) Structure et texture

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 :

- * Phénomène recherché (faisandage par protéolyse; éclaircissement des jus de fruits par pectinases)
- * Phénomène défavorable : pertes de forme etc...

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.

6) Modification de la valeur alimentaire

Dans le cas de produits obtenus par fermentation, la structure, les qualités hygiéniques, organoleptiques et nutritionnelles sont actuellement bien contrôlées.

Les microorganismes intervenant dans ces processus consomment des molécules à valeur énergétique élevée et la valeur calorique des produits fermentés est donc généralement inférieure à celle du produit initial.

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).

Pour la plupart de nos aliments, le développement d'une flore microbienne superficielle se fait à partir de glucides simples et d'azote non protéique. Ainsi dans le cas des viandes et poissons, l'altération de surface se traduisant par la formation de limon (poisse) et d'odeurs caractéristiques n'est pratiquement par accompagnée de protéolyse, donc d'une modification sensible de valeur nutritionnelle jusqu'à 10⁹ germes/cm².

Quand des phénomènes de protéolyse apparaissent, ils sont suivis par la formation de dérivés d'acides aminés qui confèrent aux produits des odeurs, goûts et texture tels, qu'ils deviennent inconsommables.

II - 3 . Principaux paramètres de contrôle de la prolifération microbienne dans nos aliments

De nombreuses caractéristiques physicochimiques de l'aliment et de son environnement conditionnent le développement des microorganismes .

II - 3 - 1 - Caractères propres à l'aliment

II - 3 - 1 - 1 . Structures biologiques

La présence d'enveloppes, coques, peaux etc. confère à certains aliments une excellente protection contre la prolifération microbienne (testas des graines, enveloppes des fruits, coquilles des noix, des oeufs, peau des animaux, etc.)

L'altération de ces protections naturelles se traduit souvent par une contamination / prolifération. Les emballages ont pour but principal de protéger l'aliment stabilisé ou non de la contamination .Il faut signaler qu'il existe des **emballages comestibles**.

II - 3 - 1 - 2 . Agents antimicrobiens naturellement présents

Le lait frais contient des lacténines et des facteurs anti-coliformes à activité limitée dans le temps. L'oeuf contient du lysozyme actif sur des germes à Gram positif. Les airelles contiennent de l'acide benzoïque actif sur les levures et moisissures ; des composés comme le thymol (thym), l'eugénol (clou de girofle) ou l'aldéhyde cinnamique (cannelle) ont des activités antimicrobiennes.

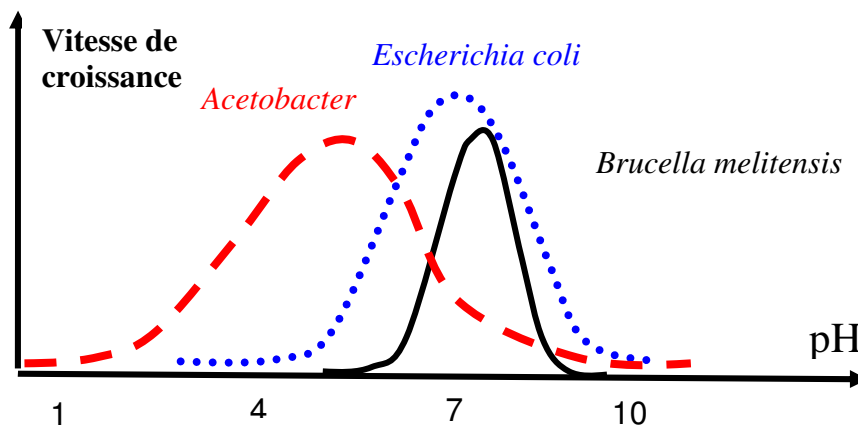
II - 3 - 1 - 3 . Composition chimique de l'aliment

Pour proliférer, les microorganismes doivent trouver dans l'aliment des substances nutritives. Rappelons que les microorganismes dangereux sont pour la plupart hétérotrophes chimio-organotrophes et doivent donc trouver leur énergie dans les composants de l'aliment. Ils doivent aussi y trouver de l'eau, une source d'azote, des minéraux et pour certains des vitamines et des facteurs de croissance.

Plus la diversité de composition d'un aliment est grande (produits animaux tels que les viandes et dérivés, le lait ...) et plus sa susceptibilité à servir de milieu de culture est grande.

II - 3 - 1 - 4 . pH

Pour un microorganisme donné, la vitesse de croissance en fonction du pH passe par un optimum. Ce sont souvent des activités enzymatiques sensibles au pH qui sont les facteurs limitants de la croissance microbienne.



Ainsi, c'est indirectement la conformation que prennent les protéines dans un milieu à un pH donné qui est responsable de l'expression de l'activité de ces molécules. Si à un pH donné, la conformation est telle que la macromolécule n'ait plus aucune activité, la croissance s'arrêtera si l'activité de cette macromolécule est indispensable à la vie du microorganisme.

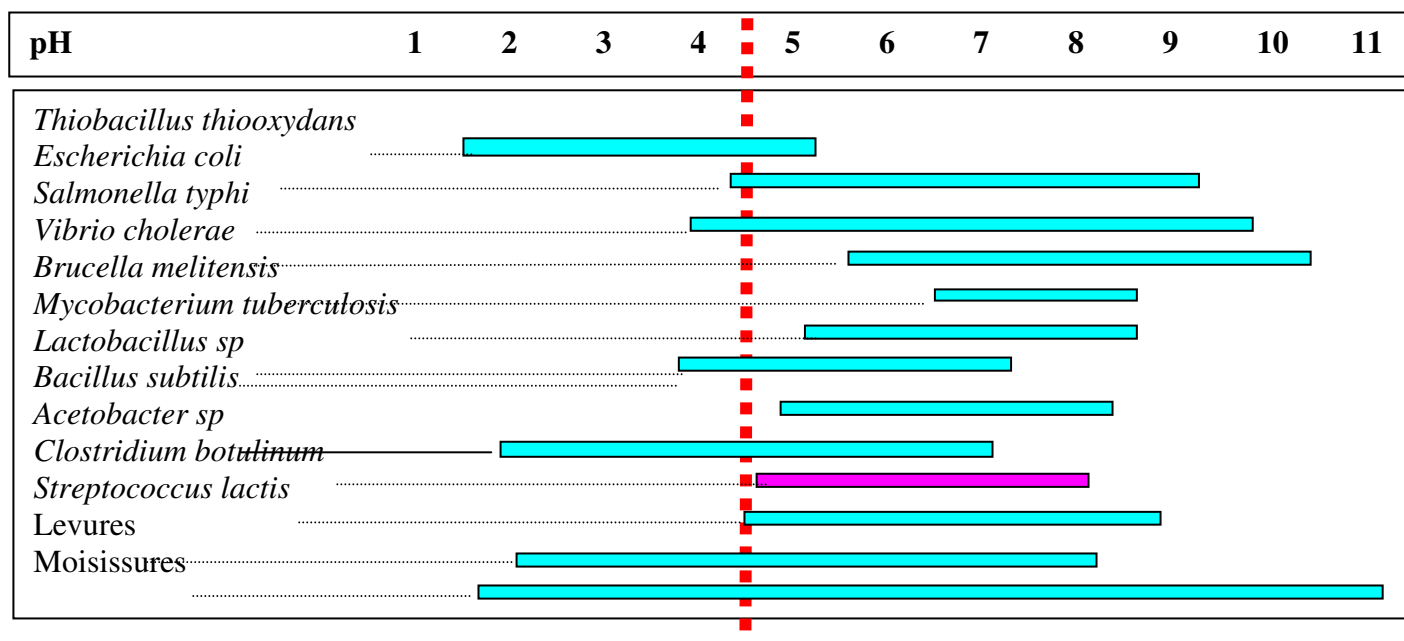
Par rapport au pH il est habituel de considérer deux groupes d'aliments : ceux dont le pH est inférieur à 4,5 et ceux dont le pH est supérieur à 4,5.

Dans la première catégorie les microorganismes dangereux ne se multiplient généralement pas et *Clostridium botulinum* n'élabore pas sa toxine.

L'**acidophilie** est une propriété que l'on rencontre surtout chez les levures, les moisissures et chez certaines bactéries qui sont classées en fonction de la nature de l'acide qu'elles produisent (bactéries acétiques, lactiques, propioniques, ...)

Dans les aliments dont le pH est compris entre 4,5 et 9,5, de nombreuses altérations sont susceptibles de se produire et la plupart des bactéries pathogènes cultivent dans ces conditions.

Le pH de l'aliment favorisera d'autant mieux la prolifération qu'il sera voisin du pH optimum de croissance.



Le pH des aliments est parfois évolutif (transformation du glycogène en acide lactique au cours de la *rigor mortis*, niveau de maturité des légumes et fruits ...) et peut ainsi varier de plusieurs unités. Le pH de quelques produits alimentaires est indiqué ci-dessous :

| aliment | pH | aliment | pH | aliment | pH |
|----------------------|---------|--------------------|---------|---------------------|---------|
| boeuf | 5,1-6,2 | asperges | 5,0-6,1 | orange | 3,0-4,3 |
| jambon | 5,9-6,1 | haricots | 4,8-5,5 | pêche | 3,4-4,2 |
| veau | 6,0-6,2 | haricots verts | 4,9-5,5 | poire | 3,8-4,6 |
| poulet | 6,2-6,4 | betterave | 4,2-5,8 | ananas | 3,5-4,1 |
| canard | 6,0-6,1 | choux de Bruxelles | 6,3 | prune | 2,8-3,0 |
| saucisse (Francfort) | 6,2 | choux | 5,4-6,0 | melon | 5,2-5,6 |
| poissons (général) | 6,6-6,8 | carottes | 4,9-5,6 | airelle | 2,3-2,5 |
| morue | 6,0-6,2 | céleri | 5,7-6,0 | cassis | 3,0-3,4 |
| maquereau | 5,9-6,2 | maïs | 6,1-7,0 | dattes | 6,2-6,4 |
| saumon | 6,1-6,5 | laitue | 6,0-6,2 | raisin | 3,5-4,5 |
| sardine | 5,7-6,6 | olives | 3,6-3,8 | citron | 2,2-2,6 |
| crevettes | 6,8-7,0 | olives mûres | 5,9-7,3 | pomme | 2,9-3,5 |
| crabes | 7,0-7,1 | oignons | 5,3-5,8 | banane | 4,5-4,7 |
| huîtres | 4,8-6,3 | champignons | 6,0-6,5 | figue | 4,6-5,0 |
| poissons blancs | 5,5 | persil | 5,7-6,0 | mûre | 3,0-4,2 |
| hachis | 5,5-6,2 | pois | 5,6-6,5 | myrtille | 3,2-3,6 |
| lait de vache | 6,5-6,8 | concombre | 2,6-3,8 | cerise | 3,4-3 |
| beurre | 6,1-6,4 | piment | 4,3-4,9 | pamplemousse | 3,2-3,4 |
| crème | 6,5 | pomme de terre | 5,4-5,9 | porc + haricots | 5,1-5,8 |
| fromages | 4,5-5,9 | épinard | 4,8-6,0 | soupe de viande | 6,0-6,2 |
| parmesan | 5,2 | tomate | 4,2-4,5 | soupe de haricot | 5,7-5,9 |
| Roquefort | 4,7 | navets | 5,2-5,5 | soupe de poulet | 5,5-6,5 |
| | | pomme | 2,9-3,5 | soupe de champignon | 6,3-6,7 |

II - 3 - 1 - 5 . Activité de l'eau

Les microorganismes ont besoin, pour se multiplier, d'eau disponible ; la disponibilité de l'eau est caractérisée par son activité. Ce paramètre correspond au rapport de pression partielle de l'eau dans l'aliment à celle de l'eau pure (aux coefficients d'activité près) :

$$a_{\text{eau}} = P_{\text{eau aliment}} / P_{\text{eau pure}}$$

L' a_{eau} varie entre 0 et 1.

L'humidité relative H.R. est égale à l' a_{eau} . 100 .

Les microorganismes capables de se développer dans des produits à faible a_{eau} sont qualifiés de **xérophiles**, ceux en milieux fortement sucrés ou salés respectivement d'**osmophiles** et de **halophiles**.

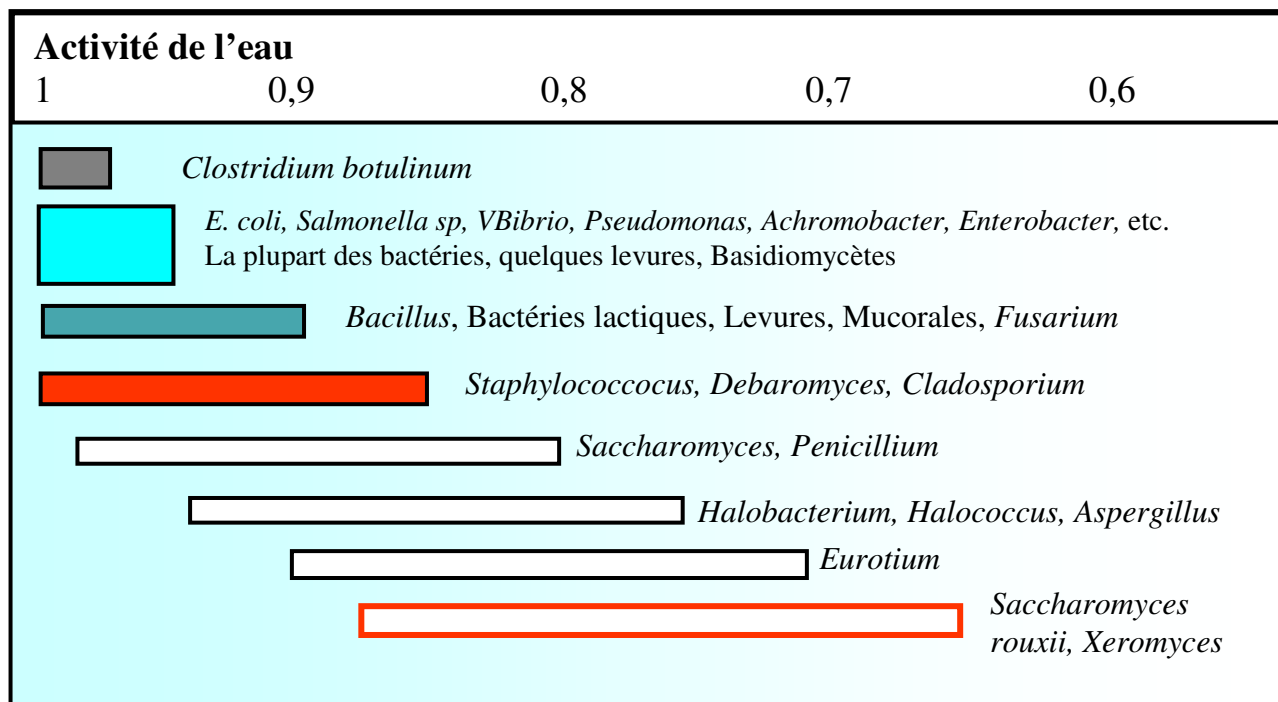
Les moyens d'abaisser l'activité de l'eau sont nombreux :

- physiques (congélation, déshydratation)
- additifs (salage, sucrage..)

Ils conduisent respectivement à des aliments congelés, séchés, aux salaisons et saumures, confitures et bonbons (cf cours de technologie alimentaire).

Pour $a_w < 0,65$ aucun microorganisme ne peut cultiver (ils peuvent survivre).

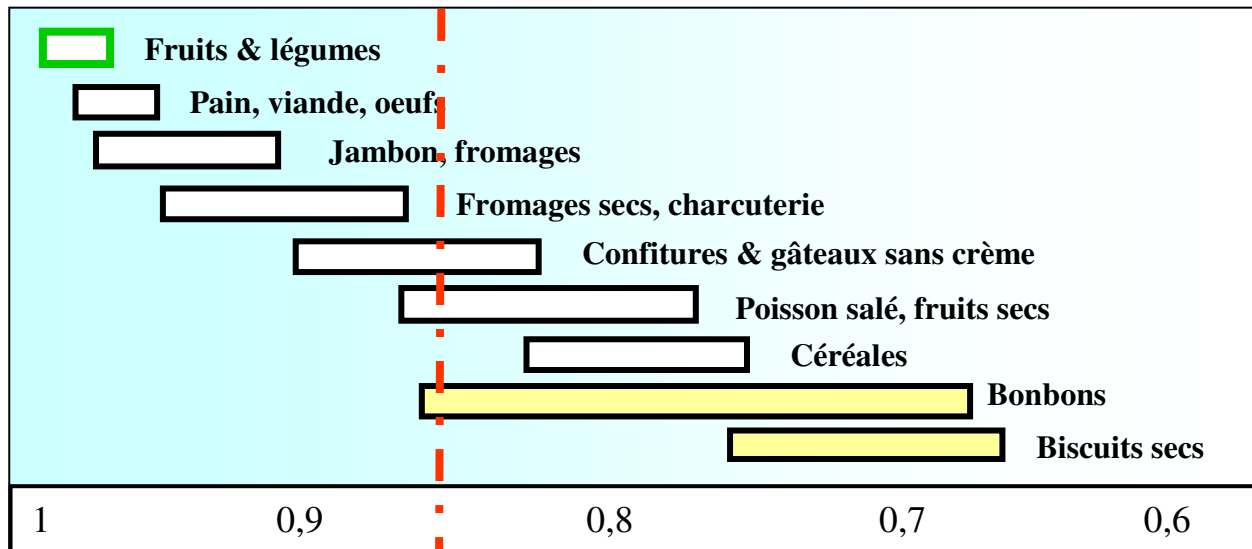
Pour $a_w < 0,85$ aucun microorganisme pathogène ne peut cultiver exception faite de certaines moisissures excrétrices de mycotoxines.



Le très fort pourcentage de mortalité microbienne observé au cours de la deshydratation, du salage, de l'addition de sucres ou de la congélation est dû, en grande partie, à la diminution d'activité de l'eau.

L'eau pure a une a_w de 1 - une solution de saccharose à 80 g dans 100 mL de 0,94, à 205 g dans 100 mL de 0,83 - une solution de NaCl à 30 g dans 100 mL de 0,9, à 51 g dans 100 mL de 0,79, saturée de 0,75 - la glace à -20°C de 0,83, la glace à -40°C de 0,67.

Il existe des corrélations entre a_{eau} et température ou composition. A une température donnée, la vitesse de croissance d'un microorganisme donné est diminuée si l' a_{eau} est abaissée. La présence de substances nutritives en "abondance" augmente les limites d' a_{eau} compatibles avec la survie du microorganisme.



Le principe de conception des aliments à humidité intermédiaire (**AHI**) repose sur l'emploi simultané de plusieurs agents dépresseurs d'activité de l'eau.

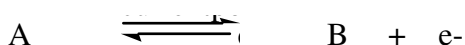
II - 3 - 1 - 6. Potentiel d'oxydo-réduction

Selon leur mode de respiration, les microorganismes sont soit **aérobies stricts**, soit **anaérobies stricts**, soit **aéro-anaérobies**, soit **micro-aérophiles** ...

Ces propriétés expliquent la diversité des altérations que l'on peut rencontrer :

- les moisissures et les levures aérobies strictes se développent en surface en formant des voiles plus ou moins épais
- les levures fermentantes se multiplient en profondeur avec production de gaz
- les *Clostridium* ne se développent qu'en absence d'oxygène (masse, conserve..)
- les *Pseudomonas* ne se développent qu'en présence d'oxygène (surface)
- les *Lactobacillus* microaérophiles ne se développent qu'à une teneur réduite en oxygène.

Dans les aliments, on peut considérer la présence ou l'absence d'oxygène comme un paramètre fondamental vis à vis des microorganismes. Le potentiel rédox résulte de l'équilibre :



La constante d'équilibre $K = [\text{Ox}] / [\text{Réd}]$

et

$$E = - RT \log K$$

E est exprimé en mV.

Dans les aliments oxydés E est positif, les aliments réduits ayant des E négatifs.

Les microorganismes aérobies requièrent des valeurs positives de E, tandis que les microorganismes anaérobies requièrent des valeurs négatives.

Certains composés qualifiés de réducteurs contribuent à l'obtention de faibles valeurs de E ; il s'agit de l'acide ascorbique, de la cystéine ou encore du glucose.

Les jus de **plantes** ont des valeurs de E comprises entre +300 et +400 mV

La **viande** en morceau possède un E voisin de - 200 mV, la viande hachée de + 200 mV. Après l'abattage la viande a un E de l'ordre de + 250 mV qui après 30 heures devient égal à -150 mV.

Les **fromages** ont un E compris entre - 20 et - 200 mV

Les *Clostridium* ne se développent qu'en dessous de -36 mV.

II - 3 - 2. Paramètres externes à l'aliment

Ces paramètres sont intimement liés aux caractéristiques de l'environnement de l'aliment et influencent à la fois la stabilité du produit et le comportement des microorganismes qu'il contient.

II - 3 - 2 - 1. Température d'entreposage

Dans les microorganismes, la température augmente la vitesse de l'ensemble des réactions dont il est le siège (anabolisme et catabolisme) ; on observe donc une augmentation de la vitesse de croissance avec l'augmentation de la température qui suit la loi d'Arrhénius. Cependant, quand la température augmente, la vitesse de dénaturation des protéines bactériennes (enzymes en particulier) augmente. Quand toutes les molécules protéiques à activité métabolique sont dénaturées, le germe a une vitesse de croissance nulle et souvent, si des enzymes participant à l'expression de son génôme sont inactivées, il meurt car ces phénomènes sont très souvent irréversibles.

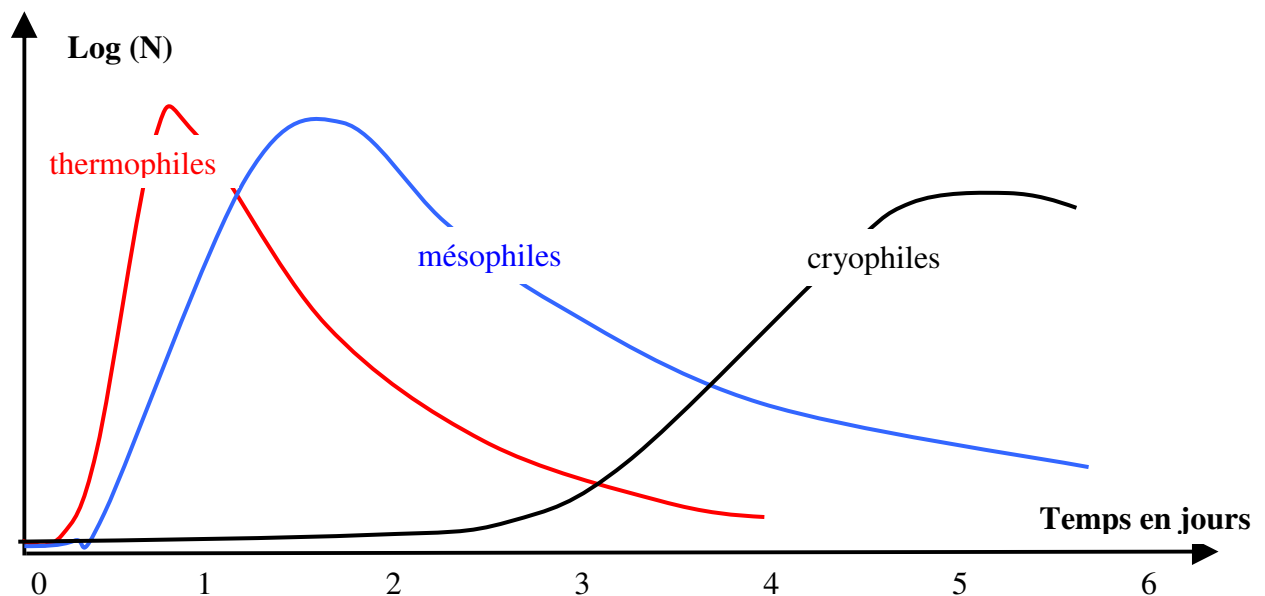
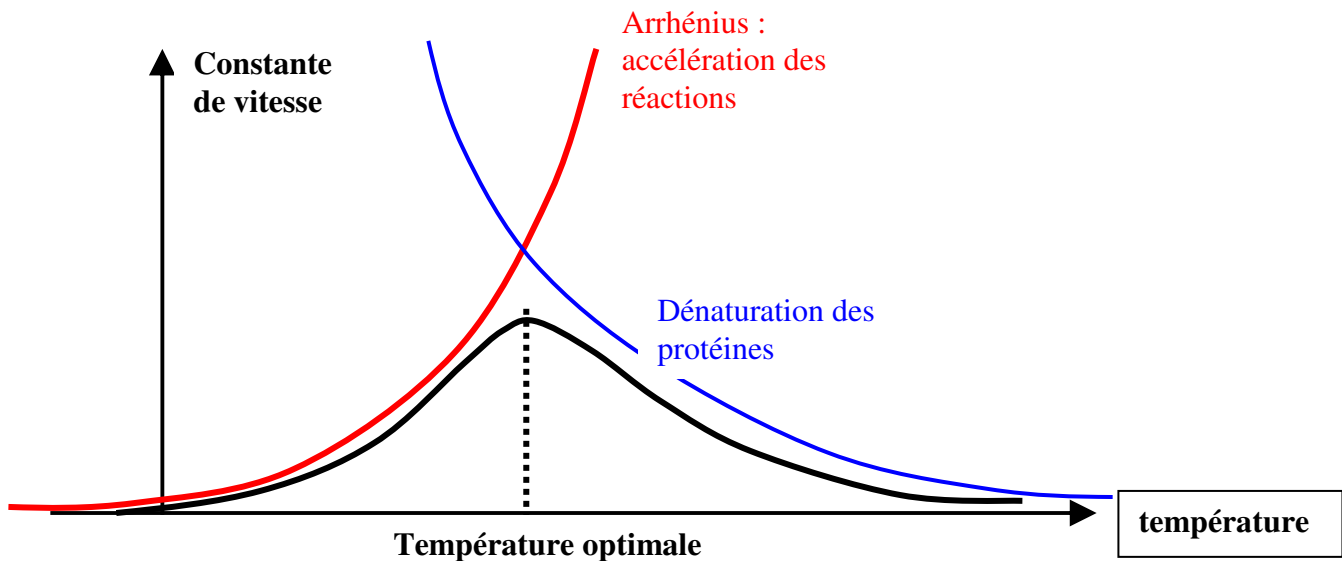
Pour des températures inférieures à la température optimale de croissance, la vitesse des réactions impliquées dans le métabolisme et donc le taux de croissance diminuent. Cependant le "froid" ne conduit pas à une dénaturation significative des composants microbiens, ce qui conduit à une reprise des activités métaboliques dès que la température atteint des valeurs qui se rapprochent de la température optimale de croissance.

Les variations de la vitesse de croissance en fonction de la température correspondent donc à la somme de deux phénomènes.

Les courbes de croissance (variations du nombre de germes en fonction du temps) sont variables en fonction des germes, ce qui les fait classer en trois principales catégories :

- les **thermophiles** qui ont une phase de latence très courte, une phase exponentielle très rapide suivie d'une phase de dégénérescence. Dans cette catégorie on rencontre des microorganismes capables de se multiplier en dessus de 45°C et parfois pour certains jusqu'à 80°C. Certains thermophiles obligatoires ne peuvent se multiplier qu'en dessus de 37°C (*Lactobacillus*, *Propionibacterium shermanii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Bacillus stearothermophilus*).

Il ne faut pas confondre thermophilie et thermorésistance qui est l'aptitude à résister à un traitement thermique donné.



Les **mésophiles** qui comprennent la majorité des microorganismes se développent entre 15 et 45°C. La plupart des germes pathogènes font partie de cette catégorie.

Les **cryophiles** ont une température optimale de croissance voisine de 15°C. Les cryophiles obligatoires ne se développent pas en dessous de 20°C. De nombreuses bactéries saprophytes appartiennent à ce groupe (*Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*) ainsi que des moisissures (*Cladosporium*, *Sporotrichum*, etc.). Ces germes sont aussi qualifiés de psychrophiles ou psychrotrophes.

Parmi les germes dangereux en microbiologie alimentaire capables de cultiver entre 0 et 10°C il faut citer: ***Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolytica*, *Vibrio parahaemolyticus***, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloïdes* et même *E. coli* entéropathogène.

La température la plus basse à laquelle un microorganisme a pu être observé en croissance est de -24°C et la plus haute de 90°C.

Le **froid** est un moyen largement utilisé de nos jours pour contrôler la vitesse de croissance des microorganismes. Au réfrigérateur, la durée de conservation est voisine de 3 à 5 jours, délai correspondant à une prolifération défavorable des germes cryophiles. La congélation à -18°C stabilise totalement l'aliment au sein duquel aucune croissance de microorganisme ne peut intervenir. Pour les **viandes** aucun germe dangereux ne se développe en dessous de 5°C et quand la température augmente de 5°C, le "temps de vie du produit" est divisé par deux.

II - 3 - 2 - 2 . Humidité relative

L'humidité relative du lieu d'entreposage influe à la fois sur l'activité de l'eau de l'aliment (équilibre dynamique) et sur la croissance des microorganismes à la surface de cet aliment. Par exemple quand un aliment a une activité d'eau de 0,6 il faut éviter que les conditions d'humidité relative de l'atmosphère environnante ne conduisent à une augmentation de l'activité d'eau en surface jusqu'à une valeur compatible avec une croissance microbienne.

II - 3 - 2 - 3 . Présence et concentration de gaz

La notion d'atmosphère contrôlée est déjà ancienne. Une augmentation de la teneur en anhydride carbonique (jusqu'à 10 %) et une diminution de la teneur en oxygène permettent une meilleure conservation des fruits et légumes (4ème gamme) en retardant le développement de certains microorganismes et plus particulièrement des moisissures.

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

II - 3 - 2 - 4 . Antimicrobiens produits au cours de la fabrication de l'aliment

Il s'agit de substances qui sont soit bactériostatiques soit bactéricides (éthanol, acides organiques comme les acides lactique, acétique, citrique, tartrique, malique, etc.).

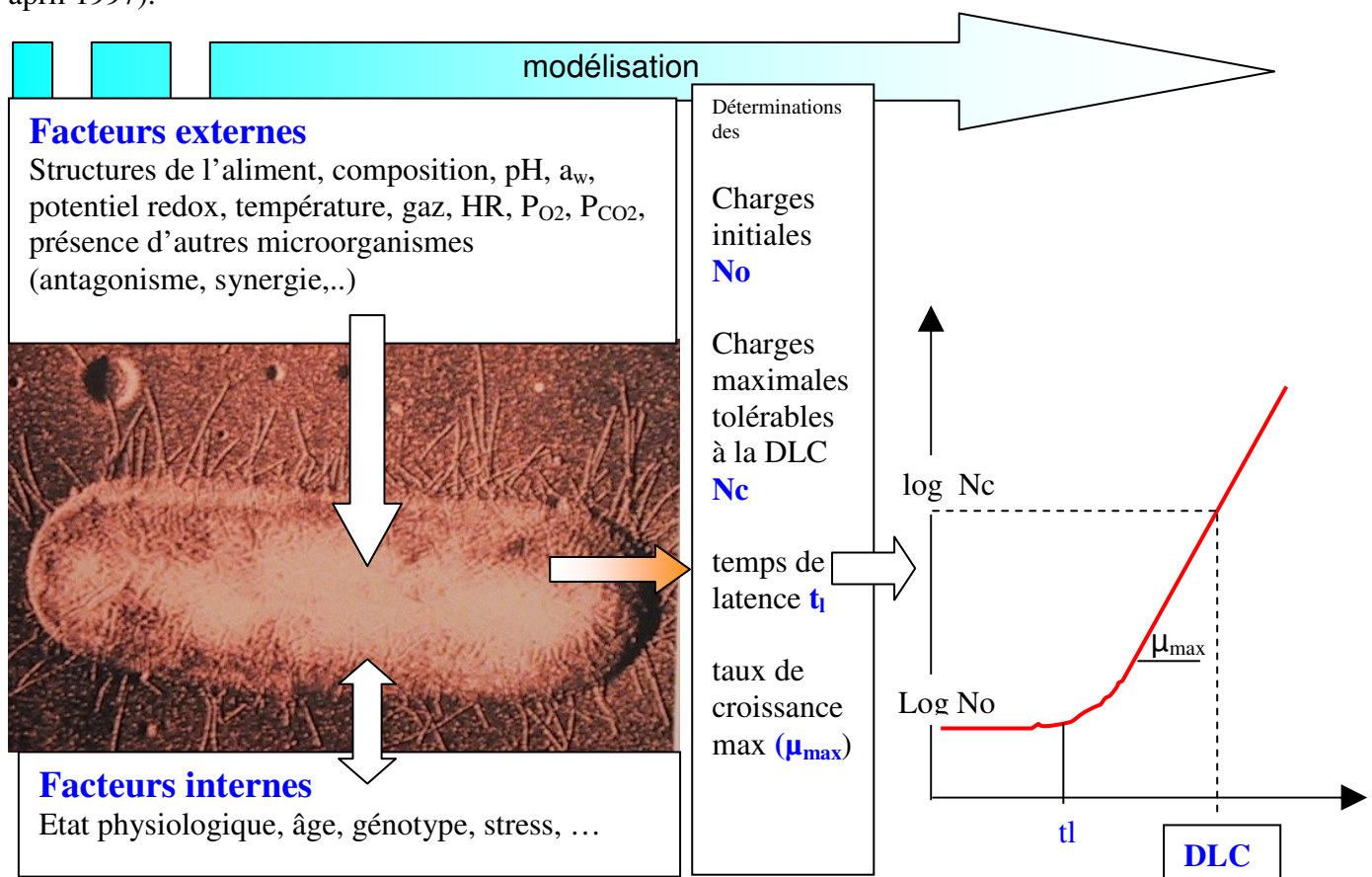
L'addition de composés antimicrobiens aux produits alimentaires (additifs) ou l'utilisation d'agents antimicrobiens divers dans l'environnement de production des aliments (agents de désinfection, de nettoyage, etc.) est réglementée et fait l'objet du cours suivant.

II - 4 . La microbiologie prédictive.

Les consommateurs sont de plus en plus attirés par les produits frais, ultra-frais et peu ou pas traités, produits aux qualités nutritionnelles et organoleptiques voisines de celles des produits naturels. Ces aliments sont généralement peu stables au plan microbiologique et doivent cependant présenter une qualité microbiologique sans faille (absence de microorganismes pathogènes et de toxines). Leur sécurité sanitaire est à assurer par leurs fabricants en même temps que le maintien de leurs qualités organoleptiques, au moins jusqu'à la date de consommation.

Aucun accident sanitaire n'étant acceptable, il est alors indispensable de connaître l'évolution des flores microbiennes tout au long de la vie du produit et en particulier **l'évolution la plus probable concernant la nature des flores (qualitatif) et leurs nombres (quantitatif) du produit alimentaire depuis la sortie usine jusqu'à sa consommation**. La **microbiologie prévisionnelle (ou prédictive)** s'appuie pour atteindre ces objectifs sur l'emploi de modèles mathématiques. La durée limite de consommation (DLC) est ainsi fixée : au-delà de la valeur fixée les risques microbiologiques deviennent élevés.

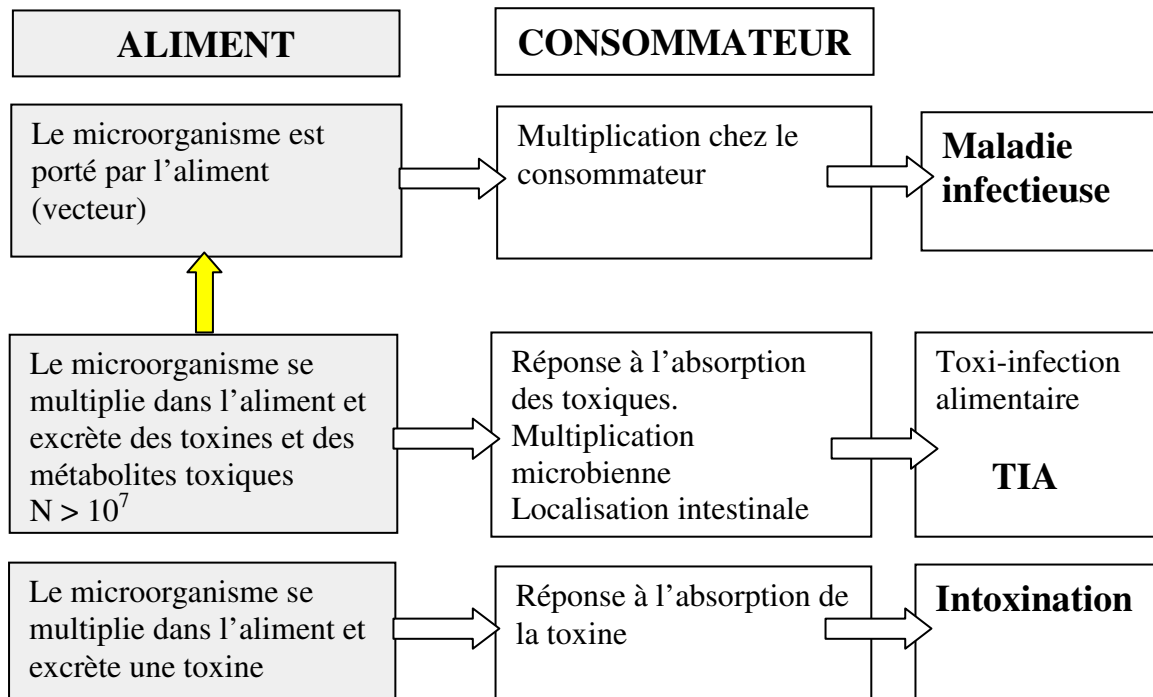
C'est à partir des paramètres de contrôle qui viennent d'être décrits que Roberts et Buchanan ont proposé des modèles prédictifs de durée de vie des produits alimentaires. Cette durée est une fonction polynomiale dans laquelle sont prises en considération les facteurs influençant la survie et la croissance microbienne (structure, composition, pH, a_w , température etc.). Une revue est dédiée à ce thème (Food Technology, avril 1997).



II. LES MALADIES MICROBIENNES TRANSMISES PAR LES ALIMENTS

Les aliments peuvent être les vecteurs ou de véritables milieux de culture de microorganismes. Ils sont alors potentiellement capables de provoquer diverses affections chez le consommateur dont la gravité dépend d'abord de la nature et du nombre de microorganismes et/ou de la toxicité de leurs produits d'excrétion .

Chaque système **aliment / microorganisme / consommateur** est particulier. Néanmoins il est possible de schématiser les principales interactions susceptibles de se produire de la façon suivante :



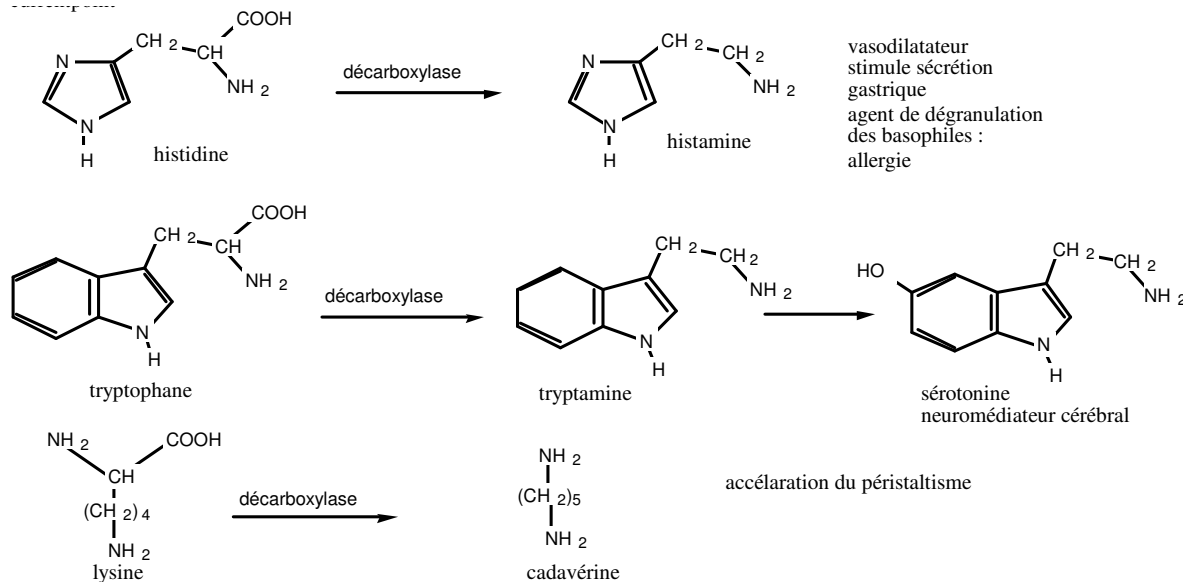
Parmi les **maladies infectieuses** d'origine alimentaire, les plus fréquemment rencontrées résultent de l'ingestion des microorganismes appartenant aux genres *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Vibrio* et de l'ingestion de virus. Ces microorganismes se comportent vis-à-vis de l'organisme comme des parasites et se multiplient en utilisant des composants de l'organisme comme nutriments. Ils sont invasifs, souvent toxinogènes, et provoquent alors des lésions au niveau du tractus digestif mais aussi au niveau d'autres tissus (septicémie).

Il existe des microorganismes qui libèrent leur toxine dans l'organisme hôte tels que *Clostridium perfringens* avec les toxines A , B , C , D ou E produites au stade 3 de la sporulation, *Shigella*, *Escherichia coli* entérotoxigènes avec 2 types de toxines (thermostable et thermolabile), *Vibrio parahaemolyticus* , endotoxine de *Salmonella* , *Shigella*, etc.. Ces toxines ont généralement un tropisme entérique ou sont neurotoxiques.

D'autres sont invasifs par virulence: *Escherichia coli* entéro-invasifs avec des facteurs d'adhérence (K98) et les facteurs CFa 1, CFa2, CFa3 ou CFa4 et une endotoxine lipopolysaccharidique, *Salmonella* et l'endotoxine libérée au niveau des ganglions mésentériques, *Campylobacter*, *Listeria* et la listériolysine etc.

La présence d'aucun de ces microorganismes n'est acceptable dans les aliments en raison du risque qu'ils font courir au consommateur. En conséquence leur recherche se fait par la méthode présence / absence (ou tout ou rien) et la **norme** est "absence dans..".

Les **toxi-infections** sont produites par de très nombreux germes et correspondent à l'ingestion d'un produit alimentaire dans lequel la prolifération des microorganismes atteint 10^6 à 10^7 par gramme. La formation de métabolites toxiques à partir de protides est fréquente :



Une intoxication de type histaminique est caractérisée par des nausées, des vomissements, une diarrhée, des bouffées de chaleur et des oedèmes.

La prolifération des microorganismes reste le plus souvent localisée au niveau du tractus digestif et se traduit par des syndrômes variables selon les microorganismes : crampes abdominales, une diarrhée, des vomissements, la présence de sang dans les selles, de la fièvre, des céphalées.

Parmi les germes à l'origine de TIA on peut citer de nombreuses espèces de *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus faecalis*, de nombreuses entérobactéries, etc.

Les risques encourus par le consommateur ne deviennent significatifs qu'à partir d'un niveau de contamination relativement élevé (10/g par exemple) ce qui implique que la **norme** qualité hygiénique des produits alimentaires contaminés par ces microorganismes est voisine d'une centaine de germes / g ou / ml. Elle dépend évidemment du type de consommateur, de la nature et des conditions de fabrication-conservation de l'aliment et de l'espèce microbienne. Une **numération** est alors réalisée pour évaluer la qualité hygiénique du produit.

Les **intoxinations** résultent de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications botuliniques, staphylococciques et à *Bacillus cereus*. Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*C. botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*).

Dans le cas de l'intoxication botulinique, le risque pour la santé du consommateur étant extrêmement grand, aucune norme ne peut permettre de contrôler l'inocuité du produit. Dans ce cas, il faut donc adopter des conditions de fabrication - conservation qui garantissent de façon absolue la qualité sanitaire du produit.

Chaque système microorganisme - aliment - consommateur permet donc de définir la qualité hygiénique et une normalisation évidente en résulte. Plus le risque est grand et plus le niveau de tolérance dans l'aliment sera faible.

| <u>Dangers d'origine microbienne</u> | Risques | Moyens de maîtriser le risque |
|---|---|---|
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Majeur Epidémiologie d'usine | Méthodes de détection normalisées Analyses rapides Identification Traçabilité Mise en évidence de la virulence Caractérisation des <i>Listeria</i> VNC (Viabiles Non Cultivables) - Revivification |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | TIA (C) fréquente Germe ubiquitaire Entérotoxines | Détection classique (Baird Parker) – staphyslide etc Détection des toxines Détection des souches toxigènes (gène A à H). Prédiction de la toxinogénèse Traçabilité des souches (génomique) Antibiorésistance |
| <i>Salmonella</i> <i>typhi</i> <i>paratyphi</i> A, B, C <i>typhimurium</i> <i>enteritidis</i> | Majeur | Détection classique Identification (sérotypage) et traçabilité Recherche des <i>Salmonella</i> VNC |
| <i>Escherichia coli</i> <u>O₁₅₇ et souches vérotoxigènes</u> <u>Souches entérotoxigènes et/ou entéropathogènes</u> | Majeur | Détection et caractérisation des O₁₅₇H₇ et des VTEC . Sérotypage |
| <i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i> | TIAC majeure des USA et des pays anglo-saxons | Volaille incriminée dans la plupart des cas |
| <i>Clostridium botulinum</i> | Risque extrêmement grave | Maîtrise du risque par la valeur stérilisatrice, le pH, la température, l'activité de l'eau, les nitrites |
| <i>Clostridium perfringens</i> | TIAC Plats cuisinés Viande cuite | Détection classique des souches toxigènes |
| <i>Yersinia enterocolytica</i> | L'animal porteur est le porc | |
| <i>Bacillus cereus</i> | Production de toxines en conservation. Risque évident peu surveillé | Détection des germes et des toxines Typage et traçabilité |
| <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> | Risque médiatique fort | PCR - RT |
| <i>Legionella</i> | Eau chaude | |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Produits de la mer | |

| | | |
|---------------------|--|--|
| <u>Virus</u> | Risque avéré avec les coquillages / crustacés et poissons HAV (Hépatite A), Rotavirus, Adénovirus « Enterovirus » « Grippe aviaire H5N1 » ?? | Méthodes de cultures cellulaires (caco 2 ? FR4K4) Méthodes PCR et hybridation Contrôle des rejets et effluents |
|---------------------|--|--|

| | | |
|---|---|--|
| Protozoaires <i>Gardia</i> <i>Cryptosporidium</i> | Viandes Eau, environnement Rejets | Méthodes à trouver |
| Moisissures | Mycotoxines | Nombreuses Dosage par immunoenzymologie, par HPLC |
| Antibiorésistance | Risque d'extension aux germes technologiques | |
| Plancton, microalgues <i>Alexandrium</i> , <i>Dynophysis</i> | Toxines | |

I. Modes de contamination microbienne des aliments

Ils dépendent de nombreux facteurs :

- les aliments d'origine végétale non conservés n'interviennent généralement que comme des **vecteurs** de microorganismes, ceux-ci restant à leur surface

- les aliments d'origine animale peuvent être contaminés de deux principales façons :

- l'animal qui les a fourni était sain mais le produit a été contaminé secondairement (manipulations, entreposage, préparation ...) par contact avec un homme ou un animal malade ou porteur de germes ou encore par des microorganismes provenant du milieu extérieur (terre, air, poussière, table de travail).

- l'animal qui les a fourni était déjà atteint d'une maladie microbienne apparente ou inapparente, les microorganismes étant alors transmis au consommateur par la viande ou le lait.

Les aliments d'origine animale constituent de véritables **milieux de culture** pour certains germes naturellement ou accidentellement pathogènes.

II. Essai d'analyse épidémiologique

Une des difficultés de cette analyse repose sur les mauvaises conditions de l'enquête, l'échantillon analysé n'étant pas représentatif de l'ensemble de la population. Ceci résulte du fait que souvent la maladie est jugée peu grave par le consommateur. L'échantillon "analysé" résulte des démarches suivantes :

| | |
|--|-------|
| • Influence réelle de l'agent pathogène | 100 |
| • Se considèrent comme malades | 75 |
| • Consultants d'un médecin | 20 |
| • Selles obtenues et analysées | 10 |
| • Recherche et analyse de l'aliment suspecté | max 1 |
| • Signalées aux services compétents | 5 |

Les conséquences socio-économiques des maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments sont encore mal connues.

Une première étude réalisée en 1986 puis celles organisées au cours des années suivantes aux Etats-Unis par le National Center For Health Statistics estiment à plus de 100 millions le nombre de cas de diarrhée alimentaire par an. Les pertes économiques en résultant (soins médicaux, perte de productivité) dépasseraient alors 25 milliards de dollars.

Les informations dont on dispose pour la France sont encore fragmentaires. Les données concernant les pathologies liées à la consommation d'aliments dans les collectivités sont par contre relativement précises de même que pour certaines maladies dont la déclaration est obligatoire (Listeriose par exemple). Au niveau individuel « avoir la diarrhée » n'est pas toujours considéré comme pathologique.

Il n'en reste pas moins qu'une rapide estimation montre que le coût d'un seul cas de maladie microbienne d'origine alimentaire peut être globalement (perte de productivité, soins médicaux) estimé aux environs de 1 000 € : ceci représente, en tenant compte du nombre total de cas, des pertes très importantes pour notre Société. Les risques de mortalité liés à ces maladies sont faibles. Néanmoins on peut estimer à quelques dizaines le nombre annuel de victimes.

En France au niveau des collectivités le nombre de foyers est estimé entre 100 à 200 par an soit 2500 à 10 000 malades et au niveau de l'ensemble de la population à 40 000 à 100 000 cas par an.

Dans les Pays développés 1 milliard de cas de diarrhées par an et 5 millions de décès sont signalés au niveau des enfants de moins de 5 ans.

Si on effectue l'extrapolation USA ---> FRANCE (par an)

| | | |
|--------|---------------------------------------|--------------------------------|
| USA | 240 000 000 millions d'habitants..... | 100 000 000 de cas de maladies |
| FRANCE | 62 000 000 “ “ “ | 25 000 000 “ “ “ |

En France, les microorganismes qui ont été le plus souvent identifiés comme étant à l'origine de ces manifestations pathologiques sont *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens* qui interviennent dans environ respectivement 35, 25 et 20 % du nombre total de cas.

Parmi les autres germes rencontrés dans des aliments et responsables de maladies, il faut signaler *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* entéropathogène, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* et à un degré moindre *Yersinia enterocolytica*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Listeria monocytogenes*.

A ce rapide bilan il faut ajouter les affections d'origine virale et celles d'origine parasitaire liées à la présence de protozoaires (toxoplasmose, amibiase) ou d'autres organismes (trichinose, cysticercose, helminthiases, et les mycotoxicooses).

| <u>Aliments responsables (%)</u> | | <u>contribution relative des microorganismes (%)</u> | |
|---------------------------------------|---------|--|----------------------|
| 1 - Viande, charcuterie, salaisons | 40 (34) | 1 - <i>Salmonella</i> | 35 15 - 47 |
| 2 - plats cuisinés | 20 (30) | 2 - <i>Staphylococcus</i> | 25 20 - 37 |
| 3 - pâtisseries | 15 (5) | 3 - <i>Clostridium perf.</i> | 20 5 - 50 |
| 4 - oeufs, ovoproduits, crèmes | 10 | 4 - <i>Shigella</i> | 3 3 - 5 |
| 5 - laits, produits laitiers, fromage | 5 (8) | 5 - <i>Escherichia coli</i> | 5 3 - 8 |
| 6 - conserves industrielles | 2 (4) | 7 - <i>Vibrio parah.</i> | 0,5 |
| 8 - eau | 1,5 (2) | 8 - <i>Bacillus cereus</i> | inf 0,5 |
| 9 - poissons et crustacés | (5) | 9 - <i>Yersinia enteroc.</i> | inf 0,5 |
| 10 - coquillages | (3) | 10 - <i>Campylobacter</i> | inf 0,5 |
| 11 - fruits et légumes | (2) | 11 - <i>Listeria</i> , virus, Maladies parasitaires | |
| | | 12 - <i>Clostridium botulinum</i> | 0,01 (mortel à 50 %) |

Les principales causes des toxi-infections alimentaires collectives dans les années 90 indiquées dans le tableau ci-dessous. Aujourd'hui ce sont ces mêmes défauts qui sont encore à l'origine d'accidents.

| | en % des fréquences | | | |
|--|---------------------|------|------|------|
| | 1988 | 1989 | 1990 | 1991 |
| froid non respecté (mauvais froid) | 42 | 58 | 54 | 40 |
| process incorrect | 38 | 50 | 52 | 35 |
| nettoyage désinfection inadaptés | 29 | 38 | 44 | 21 |
| préparation trop longtemps à l'avance | 32 | 47 | 41 | 25 |
| matières premières contaminées | 24 | 38 | 32 | 54 |
| mauvais chaud (maintien à t° insuffisamment haute) | 20 | 19 | 22 | 14 |
| hygiène du personnel insuffisante | 24 | 24 | 20 | 17 |

III. Principales maladies bactériennes transmises

Les connaissances actuelles sur chacune des maladies d'origine alimentaire sont très nombreuses; dans ce qui suit, nous nous limiterons à décrire et à donner quelques précisions sur les maladies les plus fréquentes en France. Les média, quand ils se préoccupent de cette thématique déforment souvent la réalité par du sensationnel.

De très nombreux ouvrages, articles et revues sont aujourd'hui consacrés à ces microorganismes pathogènes présents dans nos aliments. Pour montrer les tendances, lors du colloque organisé par la Société Française de Microbiologie à l'Institut Pasteur en avril 1993, sur 37 communications, 13 concernaient les méthodes d'analyse rapide et la microbiologie moléculaire, 9 concernaient *Listeria*, 6 *Salmonella*, etc.

III - 1. Toxi-infections à *Salmonella*

Ces entérobactéries lactose -, H₂S + sont essentiellement présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux. Dans le genre *Salmonella*, plus de 2000 sérotypes sont actuellement décrits, tous présumés pathogènes pour l'homme. Quatre de ces sérotypes, correspondant aux espèces *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B et C sont à l'origine de maladies infectieuses appelées fièvres typhoïde ou paratyphoïdes. La fréquence de ces maladies a beaucoup diminué et leur traitement par antibiothérapie est bien au point (tifomycine ou chloramphénicol). De plus, il existe un vaccin (TAB-typhim) conférant une bonne protection. Si la fièvre typhoïde est peu courante en France, par contre les toxi-infections à *Salmonella* sont très fréquentes et ces **germes sont les plus souvent impliqués dans les TIA.**

La dose infectante est de quelques cellules pour *Salmonella typhi*, *paratyphi* A, B ou C, et de 10⁹ pour *S. typhimurium* et de 10⁶ pour *S. anatum*.

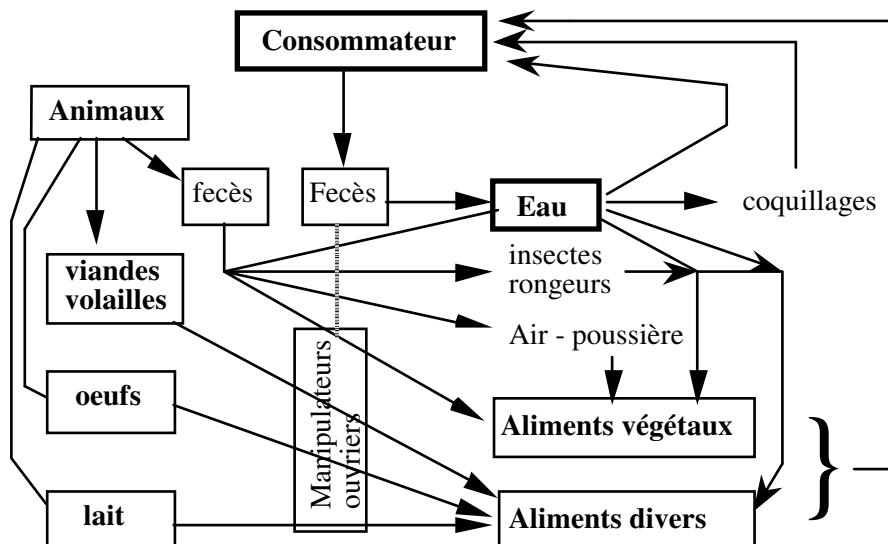
Aux USA il est relevé de 4 à 5 millions de cas de salmonellose par an se traduisant par 2 à 4000 décès. En France, il existe un service des *Salmonella* à l'Institut Pasteur (ex service du Pr Le Minor) qui chaque année fait un bilan qualitatif des espèces les plus souvent rencontrées (services hospitaliers, analyses

demandées etc.). Pour l'année 1988 les fréquences en % des espèces identifiées par ce service sont les suivantes :

| | | | |
|-----------------------|-----|------------------------|-----|
| <i>S. typhimurium</i> | 17 | <i>S. brandenbourg</i> | 3,2 |
| <i>S. enteritidis</i> | 9 | <i>S. typhi</i> | 2,9 |
| <i>S. wirchow</i> | 6,7 | <i>S. dublin</i> | 2,7 |
| <i>S. london</i> | 6,4 | <i>S. panama</i> | 2 |
| <i>S. newport</i> | 4,5 | <i>S. heidelberg</i> | 2 |
| <i>S. paratyphi B</i> | 3,7 | <i>S. wien</i> | 2 |

En ce qui concerne les toxi-infections d'origine alimentaire, ***Salmonella enteritidis*** est l'espèce la plus fréquemment impliquée (R. ROSSET , *Salmonella enteritidis* en tête de liste, Process 35 , n° 1083, mai 1993 - S.F. ALTEKRUSE et al., Control strategies for *Salmonella enteritidis* in five countries, Food Control, 1993 , 4 , 10-16).

Les autres sérotypes responsables de toxi-infections sont nombreux ; parmi ceux les plus fréquemment rencontrés dans notre pays, il faut signaler : ***S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. java*, *S. panama*, *S. montevideo*, *S. goldcoast*** etc... La contamination des produits alimentaires par des germes du genre *Salmonella* peut être **originelle** (animaux malades), résulter du **contact** d'un milieu contaminé avec l'aliment et enfin provenir de **manipulateurs malades** ou porteurs sains de germes.



Toutes les variétés d'aliments sont susceptibles d'être contaminées par ces microorganismes. Si les conditions de température, d'activité de l'eau, de pH le permettent, les *Salmonella* se multiplient. Les aliments les plus souvent mis en cause dans les salmonelloses sont les **volailles (40 %)** , les viandes et plus particulièrement les viandes hachées (10 %), le lait et les produits laitiers (15 %), les œufs (5 % avec un risque élevé pour ceux de cane ou de caille), les crèmes glacées et pâtisseries (5 %), les coquillages etc.

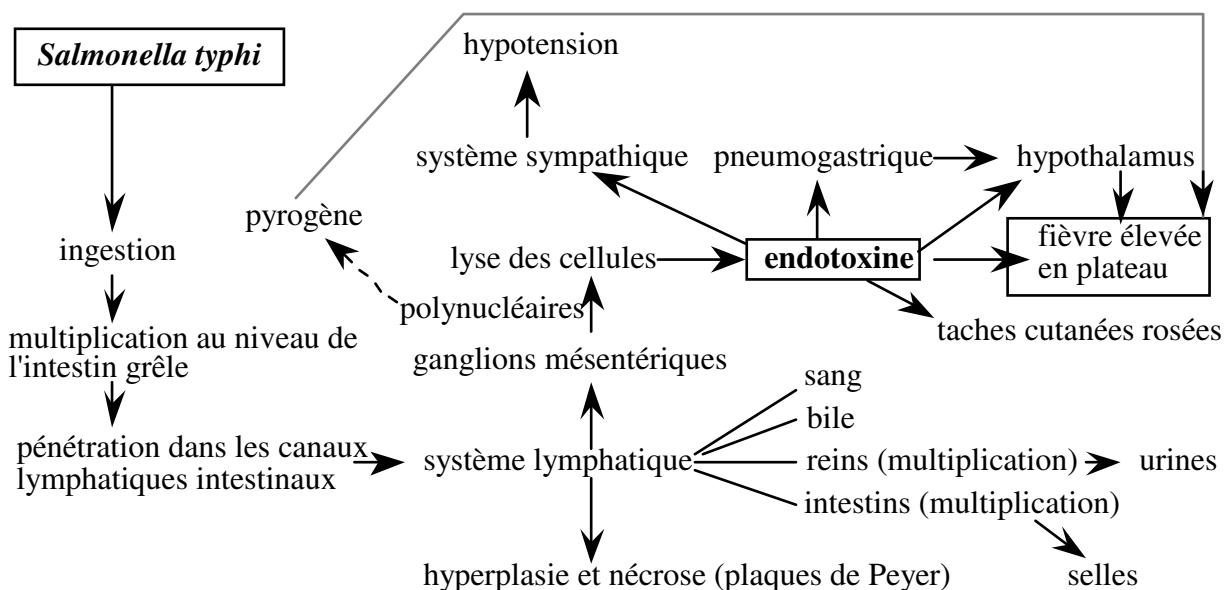
Le schéma des voies de contamination les plus probables des aliments par ces bactéries montre que ces phénomènes peuvent être verticaux (directs) et/ou horizontaux (indirects).

La consommation de l'aliment dans lequel le nombre de *Salmonella* aura atteint au moins 10^6 germes par gramme entraînera une **toxi-infection** dont les signes cliniques variables en fonction de l'espèce et de l'âge et de l'état physiologique du consommateur apparaîtront entre 5 et 72 h après l'absorption. Ils sont caractérisés par une diarrhée, des douleurs abdominales, des frissons, de la fièvre, des vomissements, un état de prostration, une anorexie, une céphalée, des malaises. Une entérite ou une infection localisée surviennent parfois. Ces signes cliniques persistent généralement quelques jours, les enfants et les personnes âgées sont particulièrement sensibles à cette toxi-infection .

Une entérotoxine sécrétée au niveau intestinal par *Salmonella enteritidis* a été mise en évidence, cette entérotoxine provoquant des perturbations dans le métabolisme hydrominéral. Le diagnostic est réalisé par l'analyse microbiologique des matières fécales du malade, malade qui risque de devenir **un porteur sain**. La proportion de ces derniers varie de quelques pourcents dans une population saine à plus de 20 % chez des individus vivant en groupe dans de mauvaises conditions hygiéniques ou par exemple chez les ouvriers d'une usine de produits carnés. L'un des problèmes actuels de la bactériologie alimentaire concerne l'augmentation du niveau de contamination de nombreuses matières premières. Rappelons que ces bactéries sont facilement détruites par pasteurisation.

Maladie infectieuse à *Salmonella*

La dose infectante avec des espèces à l'origine de maladies infectieuses graves comme *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* ou *S. paratyphi B* est de quelques cellules seulement .



Par exemple avec *Salmonella typhi*, agent pathogène strictement adapté à l'homme, la physiopathologie de la maladie qualifiée de fièvre typhoïde résulte de la multiplication *in vivo* de la bactérie et de la libération au niveau du système lymphatique et plus particulièrement au niveau des ganglions mésentériques d'une **endotoxine neurotrope**. Cette molécule libérée à partir de la paroi, d'une masse molaire supérieure à 10^6 daltons, correspond à l'antigène somatique de la bactérie dont la formule antigénique est O9,12 ; Vi ; H d. Cette endotoxine est un complexe glucido-lipido-polypeptidique encore qualifié de **LPS** (lipopolysaccharide).

Quelques données sur le LPS

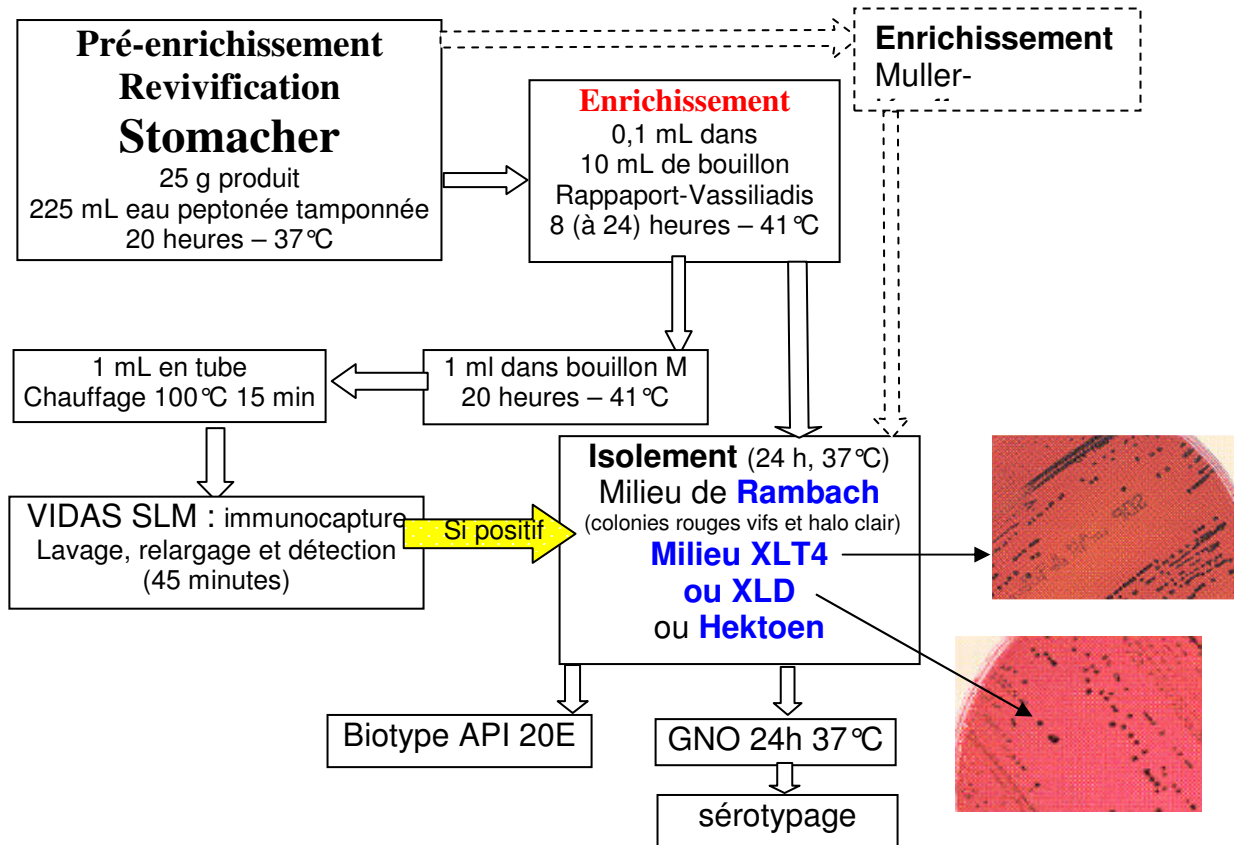
Rappelons que chez les bactéries à Gram négatif, membrane cytoplasmique et paroi sont difficilement séparables par suite d'analogies structurales. Le LPS est hydrolysable en milieu acide en plusieurs fractions :

- une fraction glucidique phosphorylée ramifiée ni toxique ni antigénique possédant une fonction haptène dont la spécificité est celle de l'antigène O
- une lipoprotéine composée d'un polypeptide de 18 acides aminés, antigénique
- le **lipide A**, glycophospholipide lié à des glycolipoprotéines et riche en glucosamine, possède les propriétés biologiques de l'endotoxine : effets pyrogène et létal.

Très souvent la **fièvre typhoïde** est considérée comme la **maladie des mains sales** !!

En raison de la faible dose infectante de ces Salmonella, la **norme concernant ces germes est de 0**, ce qui justifiera une **recherche en tout ou rien**, souvent après une phase de **revivification** (pré-enrichissement) suivie d'une phase d'enrichissement sélectif. Il se pose néanmoins le problème de définir la quantité de produit à soumettre à l'analyse pour respecter cette norme (voir les règles d'échantillonnage de l'ICMSF pour ces bactéries en fonction des denrées).

Une des méthodes appliquées dans les IAA depuis 2000 est la suivante (NF EN ISO 6579)



Aujourd'hui il existe de nombreuses méthodes dérivées de l'immuno-enzymologie et des méthodes issues de la biologie moléculaire (hybridation par des sondes fluorescentes après amplification par PCR).

III - 2. Entérototoxicose staphylococcique

Il s'agit d'une maladie microbienne très fréquente dans de nombreux pays et particulièrement en France. Elle résulte de la consommation d'aliments contaminés par des souches de *Staphylococcus aureus* toxinogènes.

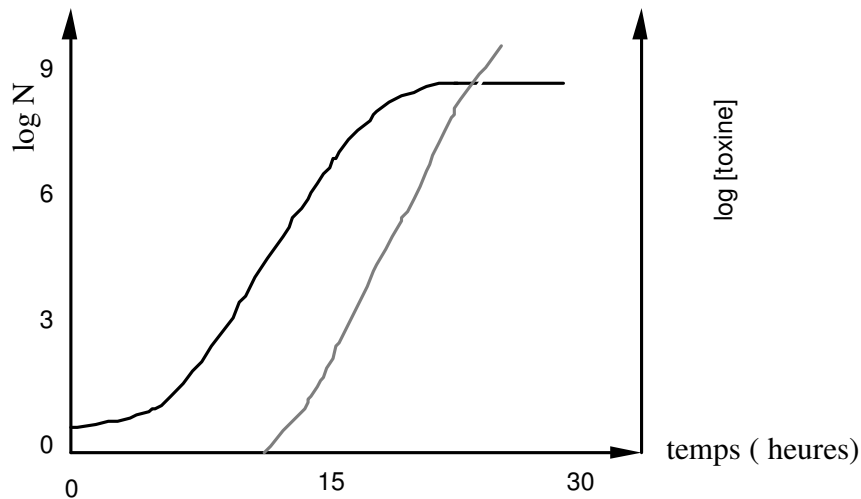
Six types d'entérotoxines sont actuellement connus (**A, B, C, D, E et F**) ; en France c'est l'entérotoxine A (65 %) qui est la plus fréquemment rencontrée, suivie de la B (20 %) et des autres types.

L'intoxication est caractérisée par une période d'incubation de courte durée (1 à 4 heures). Les symptômes de cette maladie, qualifiée parfois de **maladie des banquets**, sont caractéristiques : salivation abondante, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée abondante, sueurs, céphalée, état de prostration et quelquefois fièvre. Les symptômes disparaissent en général après 24 à 48 heures, et le malade ne développe pas de défenses immunitaires spécifiques.

Il faut signaler enfin que cette intoxication n'est qu'une des manifestations possibles du pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus*. La présence quasi constante de ce microorganisme sur la peau et les

muqueuses de l'homme et des animaux permet sa grande dispersion. Quand un aliment est contaminé, il faut qu'il soit conservé un temps assez long à une température permettant la croissance microbienne. L'entérotoxine staphylococcique étant un métabolite secondaire, elle est synthétisée en fin de phase exponentielle et au cours de la phase stationnaire de croissance. Le nombre minimum de germes nécessaires à la production de suffisamment de toxine pour provoquer l'empoisonnement est évalué selon les auteurs à 5.10^5 ou 5.10^6 germes par g.

Avec cette entérotoxine, la DE_{50} (dose émétique qui fait vomir 50 % des individus qui la reçoivent) est estimée à $0,2 \mu\text{g}$ par kg de poids corporel.



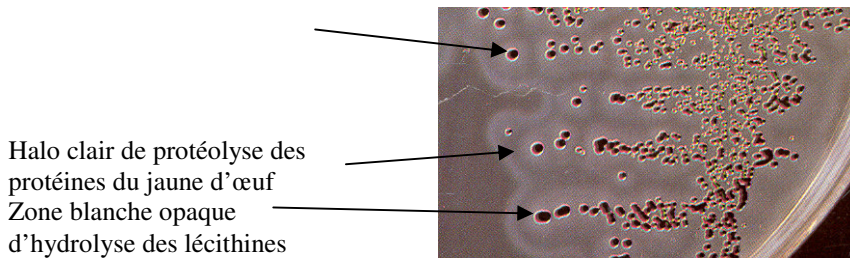
Les entérotoxines A, B, C, D, E et F sont produits par les *Staphylococcus aureus* entérotoxinogènes et une même souche peut excréter plusieurs toxines différentes. Il existe 3 variétés de la toxine C (C_1 , C_2 et C_3) et la toxine F est impliquée dans le "toxic stock syndrom". Ces toxines sont des protéines de masse moléculaire voisine de 30 000 daltons et leur point isoélectrique varie de 6,8 (A) à 8,6 (B, C_1 , C_2 , C_3). Ces protéines ne sont pas hydrolysées par les protéases digestives (pepsine, trypsine) et sont très résistantes aux traitements thermiques. Ainsi, une activité toxique (ou sérologique) persiste même après un traitement de type stérilisation (15 minutes à 121°C).

Il est donc clair que si un aliment a été contaminé, un traitement thermique du type pasteurisation (60°C , 30 minutes) permettra de détruire les microorganismes, l'aliment restant alors très dangereux par la présence éventuelle d'une entérotoxine. Les cibles de ces entérotoxines staphylococciques sont les récepteurs sensoriels gastrointestinaux périphériques qui, après interaction, transmettent via le nerf pneumogastrique des impulsions nerveuses au centre de la motilité intestinale situé dans la région hypothalamique du cerveau. Il s'agit donc d'une neurotoxine qui induit des vomissements et une hypermotilité intestinale.

Les aliments les plus communément susceptibles d'être à l'origine de cette intoxication sont par ordre décroissant de fréquence : les viandes et charcuteries, les pâtisseries, les volailles, les fromages, les légumes, les poissons.

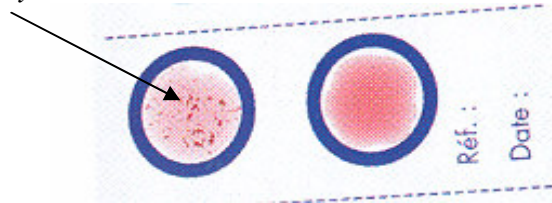
La recherche et la numération des *S. aureus* coagulase + (norme ISO 6888 d'octobre 1999) se fait pour l'essentiel sur milieu de BAIRD-PARKER. Les colonies présentent (après 24 h à 37°C) les caractéristiques suivantes :

Colonies rondes, bombées,
noires ou grisées de 1 à 2
mm de diamètre



A partir d'un prélèvement d'une colonie sur milieu gélosé, une identification de *S. aureus* rapide est réalisable par agglutination spécifique au moyen d'un latex coloré en rouge contenant 3 facteurs de sensibilisation (fibrinogène, fragment C des IgG, anticorps monoclonal spécifique) qui permettent la détection simultanée de 3 antigènes de surface (respectivement : Clumping factor, Protéine A, polysaccharide capsulaire).

Agglutination de *Staphylococcus aureus*



III - 3. Toxi-infections à *Clostridium perfringens*

Cette bactérie est vraisemblablement le germe anaérobie le plus fréquemment rencontré dans la nature. Saprophyte du sol et des eaux, elle est présente dans de très nombreux produits naturels. Elle est commensale de l'homme et des animaux au niveau de la peau et des voies digestives et même respiratoires.

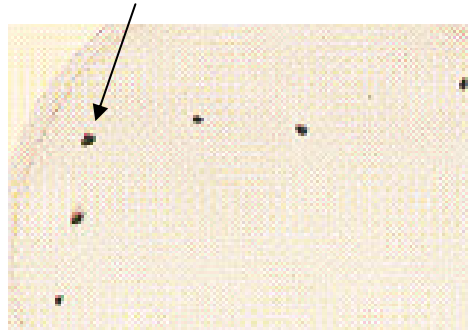
C'est grâce à sa **spore** que cette bactérie peut résister à des conditions particulièrement défavorables. Son caractère anaérobie strict limite cependant sa possibilité de développement dans nos aliments. Ainsi les conserves et les aliments cuits constituent d'excellents milieux de culture pour *Clostridium perfringens*, car la cuisson réduit le taux d'oxygène.

On distingue au moins 6 types de *Clostridium perfringens* en fonction de la nature des toxines qu'ils synthétisent et excrètent, les toxines étant au moins au nombre d'une douzaine. La toxi-infection résulte souvent de la prolifération de *Clostridium perfringens* A toxinogène dans la viande laissée à refroidir quelques heures à des températures voisines ou supérieures à la température ambiante, et ce à partir de spores dont la germination a été induite par la cuisson. En effet, les spores présentes sur la viande crue résistent à des cuissons de type "mijotage" de 3 ou 4 heures ou encore à des cuissons à 110°C pendant 30 minutes. Une charge microbienne au moins égale à 10^8 germes par g est nécessaire pour déclencher la toxi-infection.

Les symptômes de cette maladie apparaissent entre 8 et 24 heures après la consommation de l'aliment. Il s'agit essentiellement de douleurs abdominales aiguës et d'une diarrhée ; nausées, vomissements, fièvres, frissons ou prostration sont rares. Les entérotoxines d'une masse moléculaire voisine de 35000 daltons sont antigéniques et thermolabiles. Cette protéine interfère avec la production d'énergie au niveau cellulaire et affecte directement la structure et la fonction cellulaires en particulier au niveau des entérocytes.

La recherche (ou la numération) de cette bactérie est réalisée sur milieu TSC (Tryptose-sulfite-cyclosérine) selon la norme ISO 7937 (avril 1997) et ses variantes (V 08-056). L'inoculum (1 mL) est

ensemencé dans la masse de 12 mL de milieu recouvert de 10 mL (double couche) puis incubé 24 h à 37°C en anaérobiose. Les colonies de *Clostridium sulfito-réducteurs* sont noires.



La caractérisation de *Clostridium perfringens* à partir des colonies noires se fait sur milieux Thioglycolate-résazurine puis lactose sulfite.

Les spores susceptibles d'être présentes dans des matières premières destinées à la fabrication de conserves par exemple sont comptées selon la méthode V 08-407 (NPN, octobre 1989) après traitement thermique de l'échantillon à 98°C pendant 30 min puis incubation sur milieu ROSENOW cystéine à 55°C pendant 8 jours.

III - 4 . Intoxication botulinique

Cette intoxication est liée à l'ingestion de toxine botulinique synthétisée au cours de la croissance de *Clostridium botulinum* dans un aliment. Ce germe tellurique **sporulé et anaérobie strict**, fait courir un très grand risque de contamination à de nombreux aliments, notamment les conserves (boîtes et bouteilles) qui subissent un traitement thermique insuffisant.

Les caractéristiques de croissance et de contrôle des *Clostridium botulinum* de types A,B, E et F sont données dans le tableau ci-après.

La « **toxine botulinique** » est un des poisons les plus violents connus ; son pouvoir toxique est environ 500 000 fois plus élevé que celui de la strychnine et la DL₅₀ (dose qui tue 50 % des sujets qui la reçoivent) est estimée de 10⁻⁸ à 10⁻⁹ g par kg de poids corporel. C'est pour cette raison que la mortalité est élevée malgré les thérapeutiques comme les sérums antitoxiques ou les anatoxines.

Sur la base de la spécificité sérologique de leur toxine, **6 types** (A, B, C, D, E et F) de *Clostridium botulinum* ont été identifiés. Les types A, B et E sont les plus fréquemment rencontrés dans le botulisme humain. Le type E qualifié de pisciaire est rencontré chez les poissons de mer ou d'eau douce. Les types de *Clostridium botulinum* diffèrent par leur tolérance au sel et à l'activité de l'eau, leur température minimale de croissance et la résistance à la chaleur de leurs spores.

Nature des toxines

Les **toxines botuliniques** sont des protéines de masse moléculaire élevée. Ainsi la toxine de type A comprend 4 espèces moléculaires dont les masses moléculaires sont voisines de 150.000 daltons à 800 000 daltons (structure quaternaire encore mal connue).

Les toxines de 150 000 daltons de masse moléculaire possèdent un pont disulfure ; sous cette forme elles sont peu actives et sont activées par des enzymes protéolytiques endogènes à la bactérie ou par d'autres protéases. Deux sous-unités actives de 100 000 et 50 000 daltons apparaissent alors. Après ingestion elles sont captées par le système lymphatique digestif, passent dans le sang puis se fixent sur les jonctions myoneurales des fibres cholinergiques du système nerveux périphérique où elles inhibent l'activation de l'acétylcholine. Il s'en suit des troubles nerveux tels que asthénie, céphalées, vertiges, diplopie, nausées, vomissements, crampes abdominales, constipation, sécheresse des muqueuses et de la peau, de la bouche, pupilles dilatées, dysphagie, dysphonie, troubles respiratoires avec paralysie.

Quelques données concernant les *Clostridium botulinum* sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

| type | découvert en | température de croissance (°C) | | | valeurs minimales pour cultiver | | spores (à 110°C) | spores (kGy) | Inhibition par NaCl |
|---------------------------------|--------------|--------------------------------|-----|-----|---------------------------------|----------------|------------------|--------------|---------------------|
| | | min | max | opt | pH | a _w | D min | D | (% , P/V) |
| A (protéolytique) | 1904 | 10 | 50 | 35 | 4,7 | 0,94 | 2,8 | 1,4 | 10 |
| B (protéolytique) | 1896 | 10 | 50 | 35 | 4,7 | 0,94 | 1,35 | 1,2 | 10 |
| B (non protéolytique) | 1960 | 3,3 | 45 | 33 | 4,7 | 0,97 | | | 6 |
| E (non protéolytique) | 1936 | 3,3 | 45 | 33 | 4,8 | 0,97 | 0,8 | 1,2 | 6 |
| F (protéolytique) | 1960 | 10 | 50 | 35 | 4,8 | 0,94 | 1,6 | 1,7 | 9 |
| F (non protéolytique) | 1965 | 3,3 | 45 | 32 | 4,8 | 0,97 | 0,5 | 1,5 | 6 |

La fréquence de cette maladie, dont la déclaration est obligatoire semble en augmentation. La plupart des cas affectent soit des individus soit des cellules familiales et mettent souvent en cause des aliments de fabrication ménagère ou artisanale. Ils concernent le plus souvent des viandes, des jambons, des poissons, des pâtés, parfois aussi des légumes tels que haricots ou asperges.

Il faut noter ici que les aliments **acides, de pH inférieur à 4,5**, ne permettent pas le développement de la bactérie.

Les aliments d'**a_w inférieure à 0,94** (cf tableau page 11) tels que de nombreux produits séchés et salés (souvent au sel nitré) ne permettent pas la croissance et donc la synthèse de la toxine.

Dans le cas de produits non acides, l'addition de **nitrites** permet, à partir d'une teneur de 20 ppm d'inhiber la germination et la prolifération du germe.

En raison de la gravité de l'intoxication, la qualité hygiénique des aliments ne peut reposer dans ce cas, que sur la prévention et la maîtrise de la qualité microbiologique.

Ainsi, cette prévention repose sur la fabrication de conserves correctement stérilisées, sur la **conservation au froid** de tous les aliments qui ne sont pas de véritables conserves (semi-conserves, produits fumés, etc...) et sur l'addition de **nitrites** (à une dose maximale voisine de 200 ppm) à des produits sensibles comme les jambons.

Il faut signaler que les toxines botuliniques sont dénaturées donc inactivées par la chaleur. Les données varient selon les auteurs: à 80°C il faut de 8 à 90 minutes et à 100°C quelques secondes. Une cuisson de l'aliment peut donc, dans la plupart des cas, les dénaturer et rendre l'aliment non dangereux.

Le botulisme infantile est reconnu depuis 1976. Il est lié à l'ingestion de spores de la bactérie qui colonisent et produisent la toxine au niveau du tractus digestif. Cette pathologie pourrait être à l'origine de la mort subite des nouveaux-nés.

La recherche de la toxine dans des conserves soupçonnées d'être à l'origine de la maladie peut se réaliser par la méthode des souris protégées ou par enzymo-immunologie.

III - 5. Autres maladies liées à la consommation d'aliments

De nombreux autres microorganismes sont impliqués dans des maladies d'origine alimentaire. Bien que statistiquement leurs incidences puissent être quantitativement peu importantes, il n'en reste pas moins que certaines de ces maladies, quelquefois très graves, sont à considérer avec beaucoup d'attention.

Parmi celles-ci, on peut en signaler quelques unes dont les germes responsables sont :

Shigella, *Bacillus cereus*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Escherichia coli* entéropathogènes, les streptocoques A et D.

III - 5 - 1. *Bacillus cereus*

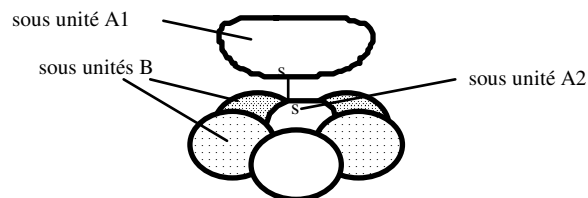
Le rôle de cette bactérie dans les maladies microbiennes liées aux aliments a été mis en évidence à partir de 1950. La prolifération importante du germe est toujours nécessaire pour que la toxicité se manifeste (de 10^5 à 10^9 germes par g). Le plus souvent, les purées de pommes de terre, les pâtisseries, les viandes diverses, le riz cuit à l'avance, sont à l'origine de cette maladie.

Deux types d'atteintes sont possibles : la première est caractérisée par des vomissements très violents qui apparaissent rapidement (30 minutes à 5 heures). La deuxième se traduit par une diarrhée abondante avec douleurs abdominales apparaissant une dizaine d'heures après le repas incriminé.

Deux toxines ont été décrites comme étant à l'origine de ces syndromes : une entérotoxine protéique qui est le facteur diarrhéique et une toxine polypeptidique qui est le facteur émétique. Plus de 10 % des sujets sont porteurs sains de cette bactérie.

III - 5 - 2. *Vibrio cholerae* et *V. parahaemolyticus*

Vibrio cholerae (sérotypes O1 et non O1) est responsable du choléra, maladie infectieuse épidémique. C'est au niveau de l'intestin grêle que la contamination et la prolifération se produisent par adhésion puis colonisation des entérocytes. La toxine cholérique provoque une fuite massive d'un fluide riziforme et la déshydratation qui en résulte peut être mortelle. Cette toxine est une protéine polymérique dont la masse moléculaire est de 80 000 daltons et dont la structure est schématisée ci-dessous.



C'est la sous-unité A1 qui entre dans la cellule "aidée" par les sous-unités B. Cette sous-unité A1 active l'adénylate cyclase entérocytaire de façon irréversible.

L'AMPc intracellulaire produit par l'enzyme à partir de l'ATP modifie le métabolisme. Au niveau des cellules de Lieberkhun de la crypte il induit une augmentation de la sécrétion d'anions tandis qu'au niveau des cellules apicales de la villosité l'absorption du chlore et du sodium est inhibée. L'eau accompagnant le transfert de ces ions est excrétée vers la lumière intestinale. L'absorption orale d'une solution saline sucrée permet de réduire la déshydratation.

Vibrio parahaemolyticus est un vibron marin halophile découvert pour la première fois en 1951 au Japon à la suite d'une toxi-infection résultant de la consommation de sardines semi-séchées. Ce germe est responsable de plus de 50 % des toxi-infections alimentaires dans ce pays. En France, sa présence dans des produits de la mer (crevettes) a été mise en évidence. Le développement du commerce international des produits de la pêche ou d'élevage va favoriser la diffusion de cette bactérie qui résiste aux opérations de congélation ou réfrigération. La maladie se caractérise par une gastro-entérite une douzaine d'heures après l'ingestion du produit alimentaire contaminé ; des vomissements, des douleurs abdominales, des nausées, de la diarrhée et de la fièvre sont fréquents. Son évolution est le plus souvent favorable après 72 heures.

Cette bactérie vient d'être récemment trouvée dans de nombreux échantillons de produits de la mer importés en France.

III - 5 - 3. *Listeria monocytogenes*

Cette bactérie « opportuniste » à l'origine d'une maladie infectieuse grave fait aujourd'hui l'objet d'une grande médiatisation. Il faut donc disposer d'un maximum d'informations sur ce germe pour maîtriser et garantir la qualité sanitaire de nombreux produits alimentaires susceptibles d'être contaminés. Le nombre de travaux consacrés aux bactéries de ce genre est actuellement très important et par voie de conséquence, le nombre de publications et revues qui leur sont consacrées est très élevé.

La maladie provoquée par *Listeria monocytogenes* est la listériose. Ses manifestations les plus caractéristiques sont une méningite et une septicémie périnatale. Sans intervention thérapeutique, la mort survient par méningite.

Le genre *Listeria* fait partie des *Lactobacillaceae* (le séquençage de l'ARN ribosomique 16 S et le G + C de 38 %, rapprochent *Listeria* du genre *Brochothrix*). Parmi les huit espèces de *Listeria*, *L. denitrificans*, *L. innocua*, *L. murrayi* ou *grayi*) ne sont pas pathogènes, tandis que *L. seeligeri*, *L. ivanovii* et *L. welshimeri* et surtout *L. monocytogenes* provoquent des maladies infectieuses chez l'homme. Toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ne sont pas pathogènes mais toutes les souches pathogènes sont hémolytiques et produisent une hémolysine. Un autre facteur associé au pouvoir pathogène est la production d'une protéine de 60 000 Da et d'une phospholipase.

Par sérotypage, 13 sérovars sont identifiables, (**4b** et occasionnellement **1/2a** et **1/2b**) sont rencontrés dans des listérioses humaines.

Par lysotypage, électrophorèse des protéines ou analyse des fragments de restriction des acides nucléiques, il est possible de caractériser environ 70 % des souches.

a) Historique

La bactérie a été découverte en 1911 par HULPHERT dans des lésions nécrotiques de foie de lapin puis par MURRAY WEBB et SWANN en 1926 chez des cobayes et de lapins atteints de mononucléose sanguine avec adénopathie et foyers de nécrose hépatique. Le nom *Listeria* lui a été donné par PIRIE en 1940 en l'honneur du chirurgien LISTER.

Les aliments pour animaux (ensilages par exemple) sont souvent à l'origine de la contamination. La première mise en cause du lait dans une épidémie en Allemagne date de 1950.

Depuis 1980 sept ou huit épidémies de listériose ont été recensés en Amérique du Nord et en Europe. La première est intervenue au Canada en 1981 : la salade et du chou cru ont été impliqués : leur fertilisation avait été réalisé par du fumier de moutons atteints de listériose (41 cas). D'autres résultent de la consommation de végétaux crus (céleri, tomate, laitue). En 1983 plus de cinquante cas sont recensés au Massachusetts avec de très nombreux décès : le lait pasteurisé provenant d'un troupeau contaminé est à l'origine de l'épidémie. Le traitement étant correct, c'est donc la thermorésistance du germe dans ces conditions qui a été mise en évidence pour la première fois. *Listeria monocytogenes* a été isolée d'un fromage « mexicain » fabriqué à partir de lait cru. En 1985, 142 cas ont été identifiés en Californie (fromage).

En Europe, de nombreux cas ont été recensés entre 83 et 87 dont la moitié « d'ordre périnatal » ; plusieurs dizaines de décès ont été observés. Ce sont des saucisses de Strasbourg consommées sans réchauffage, du pâté, des poulets mal cuits qui ont été identifiés comme étant à l'origine de cette épidémie.

En 1987, en Suisse, 122 cas et une vingtaine de décès ont pu être attribués à ce germe présent dans un fromage (vacherin). En 1989, 300 cas sont décrits en Grande-Bretagne (pâté) tandis qu'en France plusieurs centaines de cas ont été signalés à partir de 1986 (plus de 650 en 1987).

En 1992, 279 cas de listériose sont rapportés en **France** avec 63 décès et 22 avortements. La langue de porc en gelée est à l'origine de l'épidémie. C'est *Listeria monocytogenes* sérotype 4b qui est identifiée ; ce sont de mauvaises règles d'hygiène en cours de fabrication qui seraient à l'origine de cette épidémie.

En 1993, 38 cas sont répertoriés et liés à la consommation de rillettes contaminées.

En **1997** le nombre de cas est de 228. Le nombre de cas est en nette diminution.

En février 2000, une épidémie déclenche de nombreuses réactions des médias et des autorités compétentes (INVS, AFSSA, DGCCRF).

b) Pathologie et symptômes

Maladie à **déclaration obligatoire** : le médecin avertit la Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale du département.

La listériose est une **maladie animale** qui touche grand nombre d'animaux domestiques ou sauvages : ruminants, porcs, rongeurs domestiques et sauvages, oiseaux domestiques et sauvages et même les poissons. Chez les petits animaux l'infection est septicémique avec une monocytose nette et des abcès hépatiques et cardiaques. Chez les ruminants la bactérie provoque des septicémies, des encéphalites et des avortements chez les femelles gravides.

La **listériose humaine** est une maladie infectieuse liée à la consommation d'aliments ; sa durée d'incubation peut être longue (3 à 70 jours) ; elle peut se manifester sous plusieurs formes :

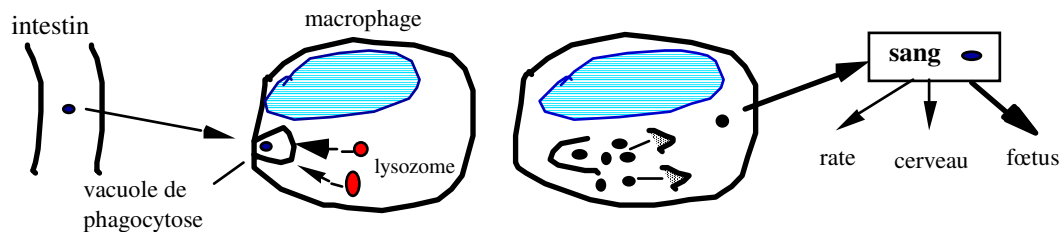
- **aiguë** avec une atteinte du système nerveux central et des méninges (la plus fréquente). Une méningite purulente et une méningo-encéphalite, une septicémie avec broncho-pneumonie, une conjonctivite, une rhinite, une sinusite, une pyélite, et des atteintes pleuro-pulmonaires traduisent le pouvoir pathogène de la bactérie. Chez l'homme les atteintes sont souvent mal individualisées
- **chronique** avec des atteintes localisées
- **légère** et inapparente chez la femme enceinte. L'infection atteindrait de préférence la femme chez laquelle elle est considérée comme une infection latente des organes génitaux.

L'infection du **nouveau-né** contaminé par voie placentaire est fréquente et apparaît dans les jours qui suivent la naissance succédant à un syndrome grippal de la mère ; le germe peut être isolé dans les urines et les sécrétions génitales de la mère. L'infection est très grave, en particulier chez les prématurés. Elle se manifeste par des signes cutanés et respiratoires, des troubles neurologiques avec liquide céphalo-rachidien puriforme et présence du germe dans les éléments éruptifs et les urines.

L'infection affecte plus particulièrement les personnes pour lesquelles l'immunité est diminuée (âge, cancer, transplantés, patient sous corticostéroïdes, ou malades du SIDA).

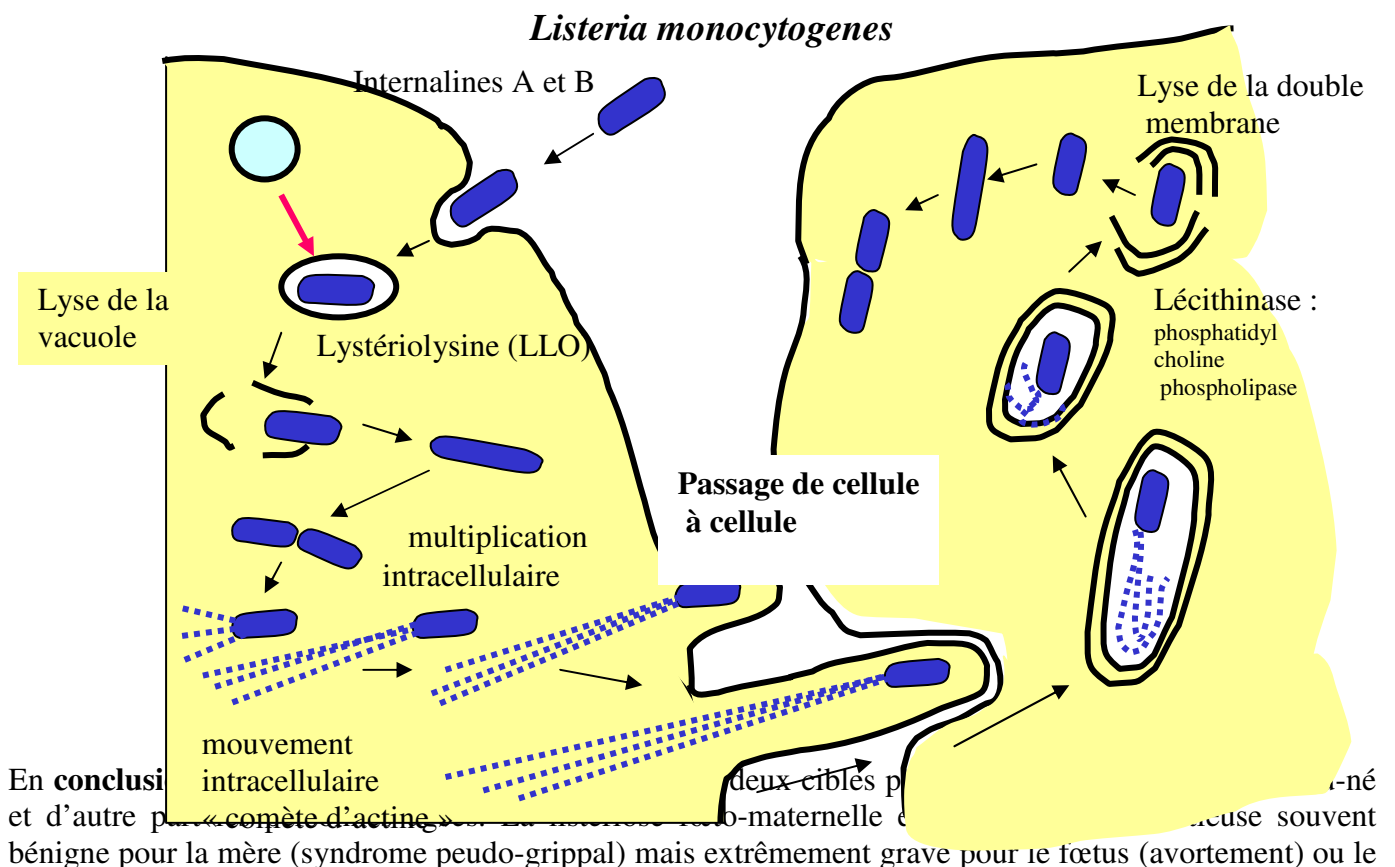
Les **symptômes** de la listériose se traduisent par une fièvre, une céphalée, des nausées, des vomissements, une pharyngite, des douleurs musculaires, une monocytose, une méningite, des lésions externes, une septicémie, des avortements. Souvent les symptômes ressemblent à ceux de la grippe.

Les *Listeria* traversent la membrane intestinale et sont pour la plupart phagocytées par des macrophages. Cette entrée dans le macrophage est liée à la présence de deux facteurs : les internalines InIA et InIB. Les lysosomes se déversent alors dans la vacuole de phagocytose. La multiplication bactérienne s'arrête mais les *Listeria* vivantes produisent une listériolysine O (en une trentaine de minutes), protéine de 529 acides aminés, qui détruit la membrane du phagosome. Les *Listeria* entrent alors au contact du cytoplasme du macrophage et se multiplient à nouveau, le macrophage étant détruit par ses propres lysosomes. Les *Listeria* se retrouvent dans le sang puis le foie, la rate et même le cerveau.



Simultanément à cette phase la bactérie synthétise des filaments d'actine qui forment une structure en « comète », ce qui engendre une force motrice nécessaire au mouvement de la bactérie (gène ActA). Les *Listeria* progressent dans le cytoplasme à 0,3mm/s et au contact de la membrane cellulaire induisent une invagination qui conduit à la pénétration dans une nouvelle cellule hôte avec une vésicule entourée de deux membranes plasmiques. Ces membranes sont lysées par une lécithinase (gènes PicB et mpl) . Cette transmission de cellule à cellule permet à la bactérie de contourner les défenses de l'hôte (anticorps circulants, complément). La plupart des gènes impliqués dans la virulence sont situés sur un îlot de pathogénicité du chromosome (15 kb).

L'organisme réagit alors en activant ses macrophages et un nombre plus élevé de lysosomes se déverse dans la vacuole et les *Listeria* meurent. Chez les immunodéprimés ou chez le fœtus et certains malades cette réaction n'intervient pas, les *Listeria* se développent et causent des encéphalites.



nouveau-né (septicémie et/ou méningite). La listériose de l'adulte affecte les immunodéprimés et les personnes âgées. Elle se traduit par une septicémie avec (ou non) infection du système nerveux central (méningite, méningo-encéphalite). La mortalité est d'environ 30 %.

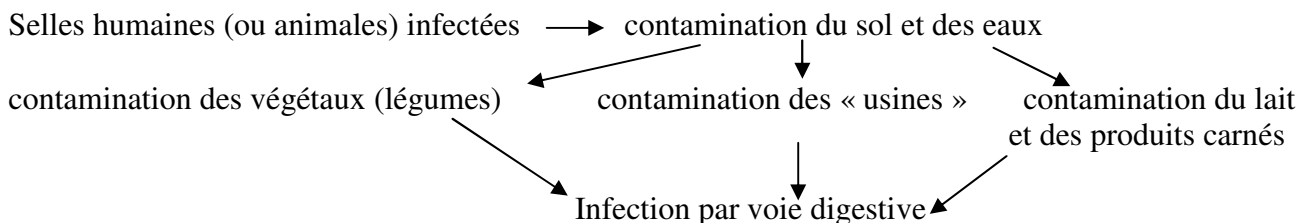
c) Épidémiologie

La listériose humaine est essentiellement diagnostiquée dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une maladie infectieuse d'origine alimentaire, *L. monocytogenes* s'implantant progressivement dans nos usines en raison de son aptitude à coloniser des zones humides (matériels, locaux, environnement) et surtout par sa capacité à se multiplier à basse température. Les aliments responsables sont soit contaminés à la production soit en cours de distribution (contaminations croisées). Depuis 1987, l'enquête réalisée par les Services Vétérinaires, les Services de la DGCCRF, la DDAS, l'Institut National de Veille Sanitaire etc. en cas d'épidémie permet en général l'identification relativement rapide de l'aliment (ou des pratiques) responsable ; les mesures préventives sont prises en conséquence (divulgaration de marque, retrait, information, etc.). Le plus souvent il s'agit d'aliments fortement contaminés (plus de 100 bactéries / g) consommés en l'état et dont la composition permet la croissance de *Listeria* ; ces aliments sont généralement conservés au froid (réfrigération).

La dose infectante est estimée à plus de 100 cellules viables et l'incubation varie entre 2 jours et plus de 6 semaines. Il existe de nombreux porteurs sains de *Listeria monocytogenes*.

L'épidémiologie est mal connue ; les animaux sont des réservoirs naturels de la bactérie qui se propage soit par contamination directe, soit par contamination indirecte par l'intermédiaire du sol, des eaux usées ou des aliments souillés par les selles ou les urines d'animaux infectés ou d'arthropodes vecteurs. Le contact avec des produits ou objets ou surface contaminés peut se traduire par une dissémination de la bactérie et une rémanence dans une usine ou un type donné de produit. Il existe chez les animaux beaucoup de porteurs sains. L'homme peut se contaminer au contact d'animaux malades.

Le schéma possible d'infection listérienne chez l'homme peut être le suivant :



La bactérie reste viable après plusieurs années d'entreposage à 4°C.

Les « **biofilms** » présents dans les usines (murs, haloirs, etc) permettent des compétitions de flore et donc la régulation de certains pathogènes. L'élimination des germes fragiles (entreposage dans des conditions drastiques comme le froid, les milieux salés, certains agents antimicrobiens, etc.,) laissent les *Listeria* particulièrement résistantes seules ; la contamination liée à leur développement devient alors plus fréquente.

La contamination directe par contact avec des animaux ou des hommes malades est rare. Ce n'est qu'en 1985 que la relation entre la listériose et la consommation de fromage a été indiscutablement établie.

La relation plante-sol, comme pour la plupart des autres germes de la famille des *Lactobacillaceae* permet la constitution d'un réservoir (source primaire). Le germe se rencontre dans les produits laitiers non pasteurisés ou recontaminés. Le changement des habitudes alimentaires avec augmentation de la consommation de produits végétaux crus, réfrigérés est aussi à l'origine de l'augmentation du nombre de cas de listérioses.

Le nombre de cas chez les adultes est compris entre 2 à 20 par million d'habitants et atteint 200 cas « périnataux » par million. Aux USA le nombre de décès estimé est au moins de 450 en 1986 pour 1700 cas au moins. La mortalité est voisine de 20 % pour des adultes âgés de moins de 60 ans et de plus de 40 % pour des personnes âgées de plus de 60 ans. Plus de 80 % des cas affectent des personnes de plus de 50 ans.

***Listeria monocytogenes* est un germe opportuniste.**

d) Thérapeutique

Listeria est sensible à l'action de la pénicilline, de l'ampicilline, de la streptomycine, des tétracyclines, du chloramphénicol, de la néomycine et de la framycétine. Parfois pénicillino résistante.

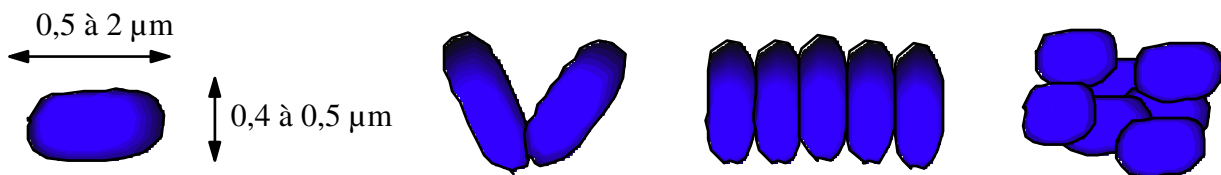
Un traitement polyvalent s'impose après antibiogramme et il faut mettre en ouvre une association pénicilline – streptomycine soit pénicilline-chloramphénicol (ou tétracycline).

Dans les cas diagnostiqués et soignés, la mortalité reste néanmoins élevée et voisine de 25 %.

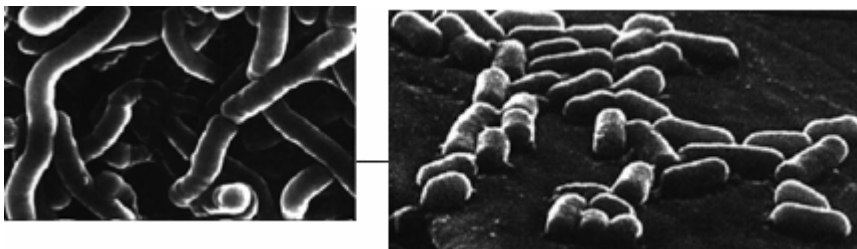
e) Morphologie de *Listeria monocytogenes*

Dans les cultures *Listeria monocytogenes* est un petit bacille Gram + (Gram négatif sur de vieilles cultures) court et trapu à bouts arrondis de 0,5 à 2 µm de longueur sur 0,4 à 0,5 µm de diamètre.

Légèrement incurvé, isolé ou en V, pouvant s'associer en palissade ou en petits amas. Dans les produits pathologiques il est isolé ou en courtes chaînettes intra- ou extracellulaires. Isolé, sa longueur peut atteindre 10 µm.



L. monocytogenes est un bacille asporulé et acapsulé (dans la plupart des conditions).



f) Caractères cultureux

Asporulé, parfois coccobacillaire, oxydase -, catalase +, cette bactérie est aéro-anaérobie (ou microaérophile), mésophile et **cultive entre +3 et +45°C** avec un optimum à 37°C. Elle est mobile par ciliation péritriche à 25 °C (germe faisant la **culbute**, la **pirouette**), et peu ou pas mobile à 37 °C. Sur gélose-mobilité le germe présente souvent un **aspect en parapluie**.

Une petite capsule mucopolysaccharidique n'est produite que par les bactéries cultivées dans des milieux enrichis en sérum ou glucose.

Cultive bien sur les milieux ordinaires (24 heures à 37°C, pH 7,3) ; sa culture est favorisée par addition de glucose, de sang ou de sérum et par une atmosphère enrichie en CO₂. Cultive dans les milieux additionnés de 10 % de NaCl, 40 % de bile ou 0,05% de tellurite de potassium.

Ne pousse pas sur les milieux au citrate de sodium.

Les limites de croissance et de survie de *L. monocytogenes* sont indiquées dans le tableau 1.

| | minimum | optimum | maximum |
|-------------------|--|------------|----------------------------|
| Température (°C) | -0,4 (lait UHT, bouillon de viande) temps de génération > 3 jours | 37 | 45 |
| pH | 4,39 | 7,0 | 9,4 |
| Activité de l'eau | 0,92 | | |
| Survie à -18°C | | | Supérieure à 6 mois |

Tableau 1. Quelques caractéristiques culturelles « limites » de *Listeria monocytogenes*.

Sur **gélose nutritive ordinaire** : petite colonie arrondie de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, lisses (S), plates, transparentes ou laiteuses, « grasses » de coloration gris-bleu et bleu-verdâtre si les colonies sont observées avec un éclairage oblique (technique de Henry). Elle peut donner des colonies plus grosses, rugueuses (R) aplaties et ternes.

En **bouillon nutritif ordinaire** : trouble homogène, dépôt floconneux avec un léger voile et une odeur aigrelette persistante.

Sur **milieu au tellurite de potassium** : petite colonie noire. La forme R du germe n'est pas virulente.

Sur **gélose au sang** : petite colonie grisâtre en goutte de rosée entourées par une petite zone d'hémolyse de type β. L'hémolysine est la toxine majeure.

La bactérie possède une grande vitalité dans les cultures qui restent vivantes plusieurs mois à la température du laboratoire et plusieurs années sur gélose au sang à 4°C.

g) Recherche, identification et numération (généralités)

Il est possible de réaliser un **enrichissement par culture au froid** : attention l'incubation requiert alors plusieurs mois ce qui est défavorable dans le cas d'une recherche nécessitant des délais de réponse courts. Dans ce cas l'enrichissement est réalisé dans du bouillon cœur-cerveille (0,1 mL dans 10 mL)

Dans les milieux de culture, le rôle des divers composés est le suivant : l'acide nalidixique inhibe certains des germes Gram +, le LiCl les germes Gram -, la cycloheximide les champignons. Les autres antibiotiques ont une action inhibitrice sélective. L'acriflavine est parfois ajoutée dans le milieu d'enrichissement à raison de 12 à 25 µg/ml.

L'isolement sélectif est réalisé sur milieu **OXFORD** (base COLUMBIA et inhibiteurs) et sur gélose **PALCAM**, *L. monocytogenes* forme des colonies noires par hydrolyse de l'esculine (cf strepto D). Ces milieux sont utilisables pour compter les bactéries en bon état physiologique. Une revivification efficace et adaptée est obligatoire pour les germes stressés.

Sur les géloses MMA et LPM, la bactérie forme des colonies qui apparaissent bleutées par trans-illumination en lumière blanche incidente avec un angle de 45°.

Un **repiquage** des colonies est alors réalisé sur milieu gélosé trypticase-soja (trypticase -soja - gélose BioMérieux) additionné de 0,6 % d'extrait de levure : milieu **TSAYE** (incubation de 24 à 48 heures à 30°C). L'identification est effectuée par la recherche de certains caractères morphologiques et biochimiques tels que l'état frais (mobilité en pirouettes), la catalase +, la coloration de Gram, une culture sur gélose au sang (gélose trypticase - soja - extrait de levure 0,6 % - sang de mouton défibriné 7%). *L. monocytogenes* génère des hémolyses avec petites zones claires (type β); *L. ivanovii* induit des zones claires nettes.

L'étude des fermentations est réalisée à partir d'une base milieu liquide :

| | | |
|----------------------------|---------|--|
| protéose peptone n°3 Difco | 10 g | |
| extrait de viande | 1 g | |
| NaCl | 5 g | |
| pourpre de bromocrésol | 15 mg | |
| eau | 1000 ml | pH 6,8 ; stérilisation 15 minutes à 121°C. |

Le glucide est ajouté au milieu à partir de solutions à 5 % stérilisées par filtration pour obtenir une concentration finale de 0,5 %. Des cloches de Durham sont placées dans les tubes de 16 x 160. *L. monocytogenes* fermente sans gaz de nombreux glucides. Après inoculation avec 0,3 ml d'une culture de 24 heures sur bouillon trypticase soja - extrait de levure (TSAYE) le milieu est incubé pendant environ 7 jours à 35°C.

Les caractéristiques biochimiques et culturales du genre *Listeria* sont indiquées dans le tableau n°2.

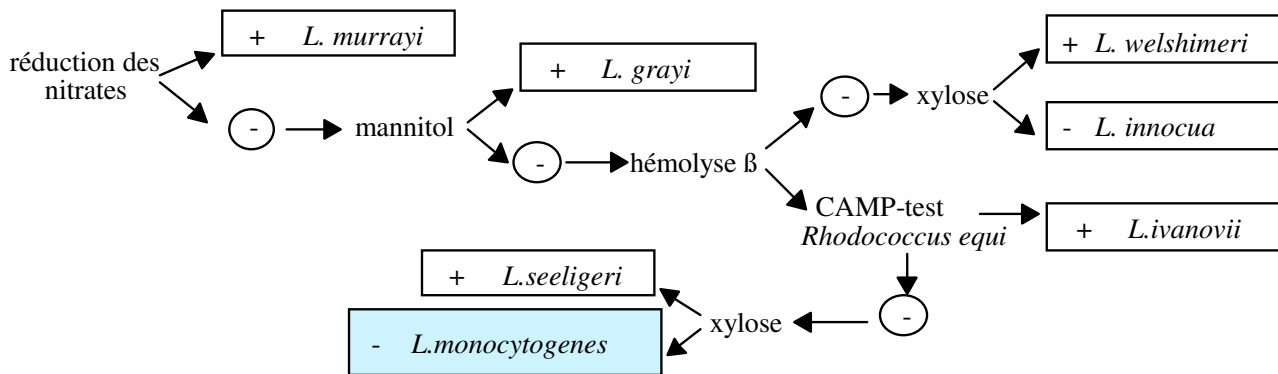
| Caractéristiques | réaction |
|-------------------------------|-------------------|
| Catalase | + |
| Besoin en oxygène | Facultatif |
| Croissance à 35 °C | + |
| Mobilité à 37 °C (pirouettes) | + |
| Mobilité à 22 °C | - |
| Rouge de méthyle | + |
| Voges Proskauer | + |
| Production H ₂ S | - |
| Glucose (acidification) | + |
| Indole | - |
| Citrate | - |
| Uréase | - |
| Mannitol | - |
| Nitrate réduit en nitrite | - |
| Gélatine | - |

Tableau 2: Biotype du genre *Listeria*

Biotype de *L. monocytogenes* :

glucose +(gaz -), esculine + (gaz -), maltose + (gaz -), rhamnose + (gaz -), xylose -, fructose +, mannose +, cellobiose +, tréhalose +, gentobiose +, mannitol -, D arabitol +, esculine+, amygdaline +, salicine +, uréase -, indole -, H₂S -, RM +, VP +, nitrate réductase -, hémolyse β +.

Il est possible de distinguer 7 espèces avec 5 caractères de la façon suivante :



h) Recherche de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires.

En raison de son caractère ubiquitaire, il est courant de rencontrer des *L. monocytogenes* dans les aliments qui n'ont pas subi de traitement bactéricide. Par contre un traitement microbicide réalisé après conditionnement ou avant conditionnement aseptique doit garantir l'absence du germe. Pour les produits alimentaires traités un critère de type absence dans 25 g est ainsi relativement logique.

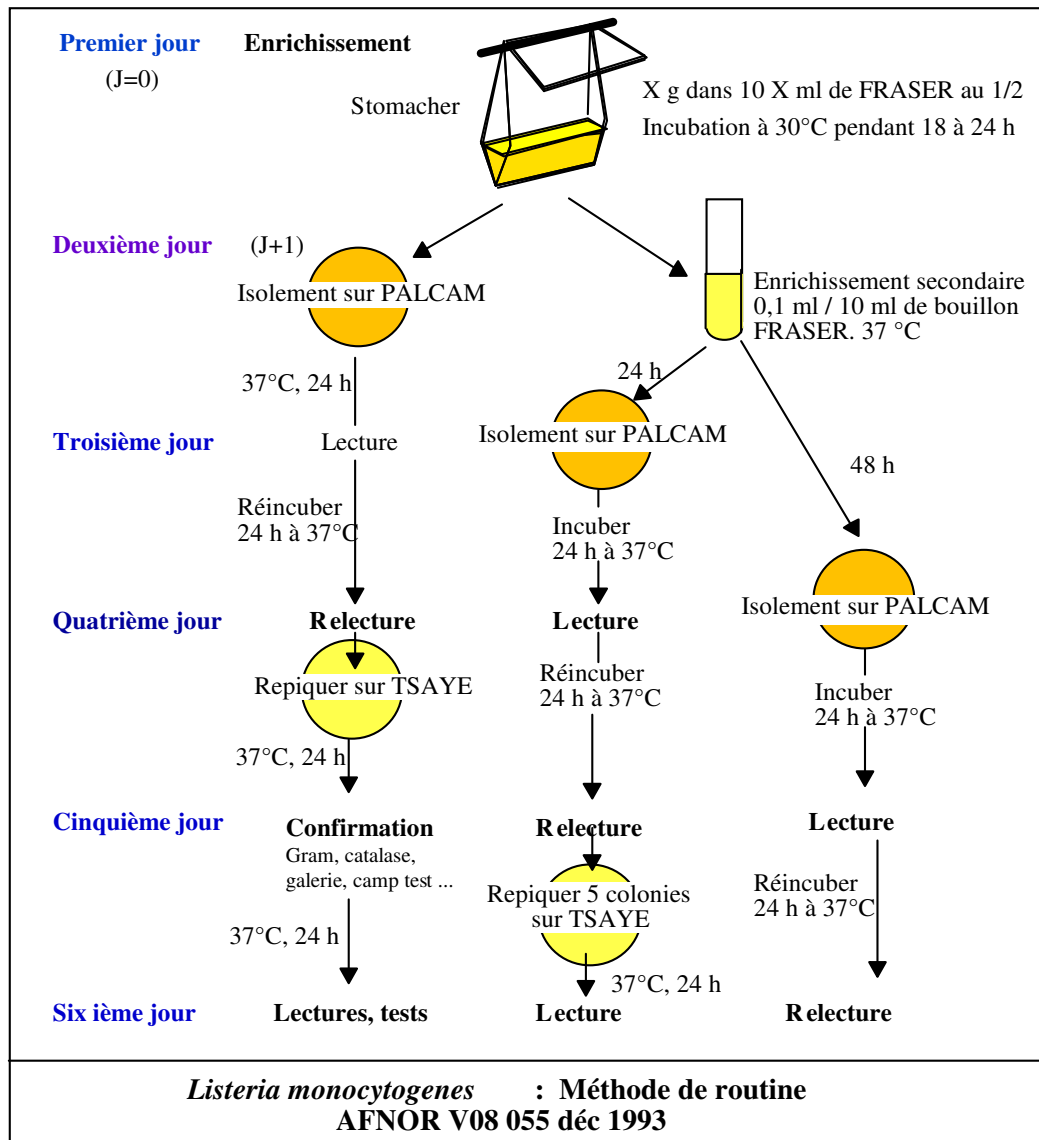
Pour les produits crus ou pour les produits ayant subi un traitement avant conditionnement, il est logique de tolérer la présence d'un petit nombre de ces bactéries (inférieur à 100 / g). Toutefois, il est obligatoire de tout mettre en œuvre pour limiter la contamination et éviter la multiplication pour arriver à une norme de 0 *Listeria* pour 25 g.

Plusieurs méthodes ont été validées:

La norme **AFNOR V08 055** (déc 1993) est une méthode de routine de recherche de *L. monocytogenes* : détection, identification. Méthode relativement lourde, elle comprend les étapes suivantes :

- enrichissement primaire sur bouillon FRASER au 1/2 (24 h à 30°C)
- isolement sur gélose PALCAM ou OXFORD (37°C, 24 ou 48 heures)
- enrichissement secondaire sur bouillon FRASER incubé 24 et 48 h à 37°C
- isolement sur gélose PALCAM ou OXFORD (37°C, 24 ou 48 heures)
-

Les colonies caractéristiques sont identifiées à l'aide de la méthode traditionnelle ou au moyen de galeries miniaturisées (la galerie API 20 STREP est bien adaptée). Cette méthode est schématisée ci-dessous :



* La norme **FIL 143** (1990) est utilisable pour la recherche de *L. monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. Simple à mettre en œuvre, ses résultats ne sont pas toujours fiables. Elle comprend deux étapes : enrichissement sur bouillon pendant 48 h à 30°C, puis isolement sur gélose OXFORD à 37 °C pendant 48 h.

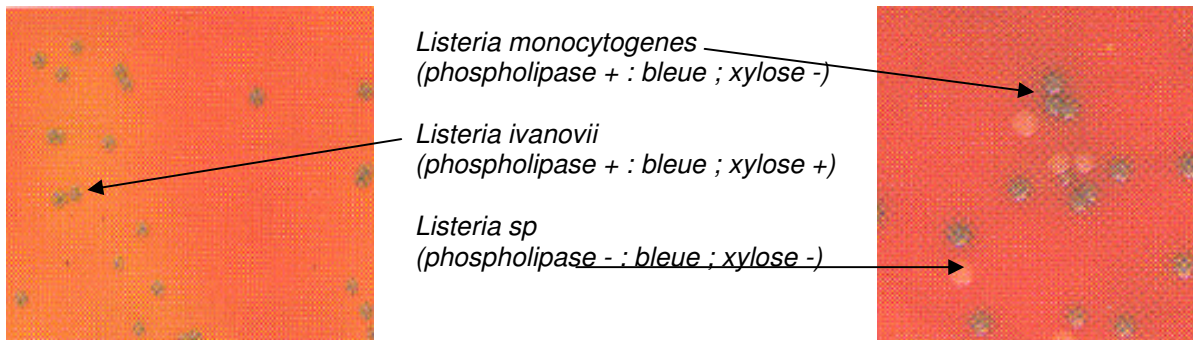
* La norme **NF EN ISO 11290-1** (février 97) pour la détection

L'échantillon est soumis à un **enrichissement primaire** dans du bouillon FRASER ½ pendant 24 heures à 30°C. L'isolement est réalisé sur milieu PALCALM ou OXFORD. La confirmation *L. monocytogenes* est obtenue avec les réponses au milieu TSYEB, l'étude des fermentations des oses, le Camp test, la mise en évidence de l'hémolyse).

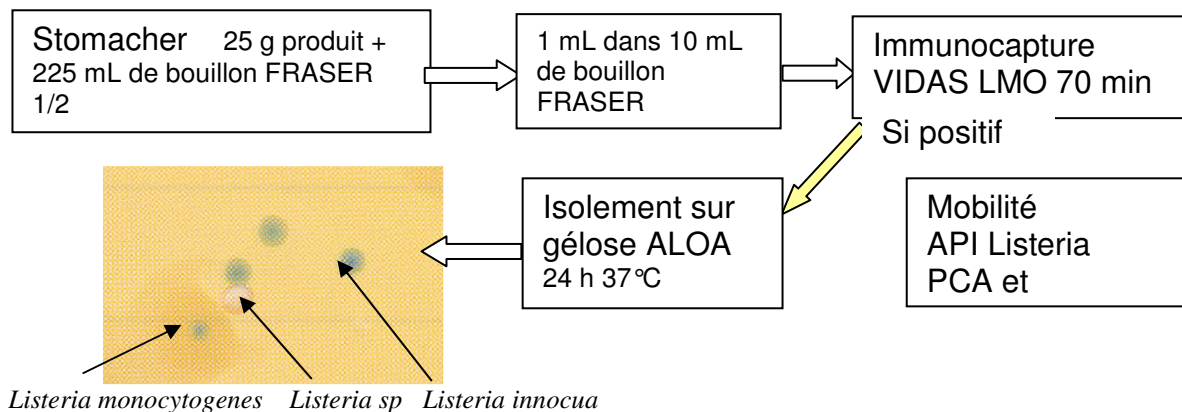
* La norme **NF EN ISO 11290-2** (août 1998) pour la numération

L'échantillon est soumis à une **revivification** dans du bouillon FRASER ½ sans LiCl ou dans un bouillon peptonné tamponné pendant 1 heure à 20°C. La numération est réalisée sur milieu PALCALM. La confirmation *L. monocytogenes* est obtenue avec les réponses aux milieu TSYEB, fermentations des oses, Camp test, la mise en évidence de l'hémolyse)

*Des méthodes récentes ont été approuvées **AFNOR en 1998 jusqu'en décembre 2002** pour détecter et compter *Listeria monocytogenes*. Le schéma analytique est pour l'essentiel identique à celui des normes ISO 11290, seul le milieu d'isolement différent : le milieu RAPID'L.mono se substituant au milieu Oxford ou Palcalm.



*Le milieu **ALOA** est en phase de validation par l'AFNOR. Il permet la détection de l'activité β -glucosidase (substrat libérant un chromogène bleu) et d'une activité phospholipasique C (halo opaque autour des colonies). Ses inhibiteurs sont le chlorure de lithium, l'acide nalidixique et des antibiotiques (ceftazidine, cycloheximide, polymyxine B).



Quelques difficultés à résoudre.

La détection d'un nombre peu élevé de *Listeria* nécessite une opération **d'enrichissement**. Il se produit des compétitions microbiennes dans les milieux qu'il est difficile de maîtriser. Il faut aussi envisager une **revivification** quand le germe est recherché dans des conditions qui lui sont peu favorables (entreposage de longue durée, produits chauffés, salaisons à faible activité de l'eau, etc).

Des enrichissements après **immunocapture** (système VIDAS), l'emploi d'anticorps fixés sur des billes magnétiques, etc., permettent d'améliorer cette étape préliminaire et devraient faciliter la mise en œuvre de méthodes sensibles et spécifiques basées sur une PCR suivie d'une détection par sonde.

i) Sérotype et Lysotype

Les 15 antigènes O et les cinq antigènes H permettent de distinguer 16 sérovars pour *Listeria*. Le sérotype 4b est le plus fréquent dans les épidémies humaines, le sérotype 1/2 est très souvent rencontré dans les aliments.

j) Méthodes rapides de détection & ELISA

Il existe de nombreuses méthodes rapides permettant de détecter cette bactérie. Citons par exemple l'extraction et la « capture » par séparation magnétique après interaction avec des lectines.

La **cytométrie en flux** après conjugaison avec des composés spécifiques (esters succinimides, isothiocyanates, anticorps, phycobiliprotéines, etc) permet de détecter et compter cette bactérie.

L'utilisation de la **PCR** (polymerase chain reaction) permet, en utilisant des « primers » définis, de détecter des gènes de cette bactérie en quelques heures (gène de l'hémolysine par exemple). La méthode est applicable à la recherche de la bactérie dans des produits alimentaires (lait, fromages, viande). La structure des amorces (16 S rDNA primers) est aujourd'hui au point et cette méthode est promise à un développement dans les années à venir.

De nombreuses méthodes **ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) sont disponibles. Elles requièrent un enrichissement préalable et parfois un enrichissement secondaire de courte durée ; elles sont en général plus rapides que les méthodes « traditionnelles » (48 voire 24 heures). La réaction immunoenzymatique ne dure que quelques dizaines de minutes. L'AFNOR a validé certaines de ces méthodes.

La méthode **VIDAS** *Listeria* est un test immunoenzymatique qui permet la détection de certains antigènes de la bactérie par la méthode **ELFA** (Enzyme Linked Fluorescent Assay, commercialisé par Biomérieux). Ce test détecte toutes les espèces de *Listeria*.

j) RFLP et sondes nucléiques.

La Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) est une analyse de différentes séquences de l'ADN génomique issues d'une hydrolyse par une endonucléase (souvent *NciI*) et visualisés après électrophorèse et coloration au bromure d'éthidium. Pour simplifier l'analyse (de très nombreux fragments sont souvent produits), une hybridation au moyen d'une sonde apte à reconnaître des régions spécifiques des hydrolysats est réalisée.

Pour plus de détails cf RIDLEY A. et SAUNDERS N.A., 1993, Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. In *New Techniques in Food and Beverage Microbiology*, KROLL R.G. and al. Edr, Blackwell Scientific Publications, pp 231-249.

La méthode **Gen-probe** *Listeria monocytogenes* est un test d'identification utilisant une sonde d'ADN spécifique à marquage chimioluminescent, complémentaire de l'ARN ribosomal de *Listeria monocytogenes* : les hybrides formés sont détectés au moyen d'un luminomètre. Ce test nécessite deux phases d'enrichissement (bouillon FRASER au 1/2 puis gélose PALCAM). Les colonies s'y développant sont soumises à une hybridation moléculaire après lyse bactérienne. La méthode de détection utilise une sonde à ADN monocaténaire marquée à l'ester d'acridium. Cette sonde a une structure complémentaire d'une séquence de l'ARN ribosomal spécifique des *Listeria monocytogenes*. En cas d'hybridation, les complexes ADN-ARN sont détectés par un luminomètre, les sondes non hybridées étant préalablement éliminées. La détection des hybrides résulte de la transformation en milieu alcalin de l'ester en acridone avec libération de photons. Leur mesure exprimée en RLU détermine la conclusion. Cette méthode donne 4 % de faux positifs (produits carnés et produits de la pêche) et aucun faux négatif.

Cette méthode est rapide et permet dès les premières 24 heures d'enrichissement de détecter les bactéries. Test validé AFNOR pour tous produits alimentaires le 13 nov 1996.

Associées à la PCR l'intérêt de ces méthodes sera accru.

k) Distribution dans la nature et dans les aliments

Les sources primaires de la bactérie sont les tissus, urine ou lait des animaux malades. Cette maladie mondiale est « rare ». Les produits incriminés sont essentiellement le lait, les produits laitiers, les œufs, les viandes et dérivés, les volailles et les légumes consommés crus.

La plupart des **animaux** domestiques ou sauvages sont porteurs de la bactérie (féces de bovins, ovins, porcins, volailles, renards, lapins, oiseaux, poissons, crustacés, insectes, etc). Ces animaux porteurs sains disséminent la bactérie dans leur environnement. En élevage plus de 80 % du cheptel peut être porteur. Les pâturages sont ainsi contaminés par les déjections ou les épandages ou des fourrages. La bactérie peut aussi survivre de longues années dans le **sol**.

Les **ensilages** sont souvent contaminés, et ce d'autant plus que le pH est élevé : pour des pH > 5,0 plus de 60 % des fourrages sont porteurs de *Listeria*, tandis que ce pourcentage est de 40 % à pH 4, 5 et n'est que de 20 % pour des pH inférieurs à 4. Si le pH remonte par protéolyse microbienne la bactérie se multiplie intensément. Les températures hivernales n'inhibent pas la prolifération du germe. L'ammoniation des pailles et foin amène le pH à 8,5 – 9,0 ce qui n'inhibe pas le développement de la bactérie. Les ensilages de qualité médiocre renferment 10^4 *Listeria* par gramme. Un mouton qui consomme 1,5 kg d'ensilage par jour ingère donc $1,5 \cdot 10^7$ germes. Une vache qui consomme 20 kg d'ensilages ingère environ 10^8 *Listeria* par jour.

Plus de 50 % des **féces des animaux** contiennent la bactérie et sont à l'origine de la contamination de la viande et du lait.

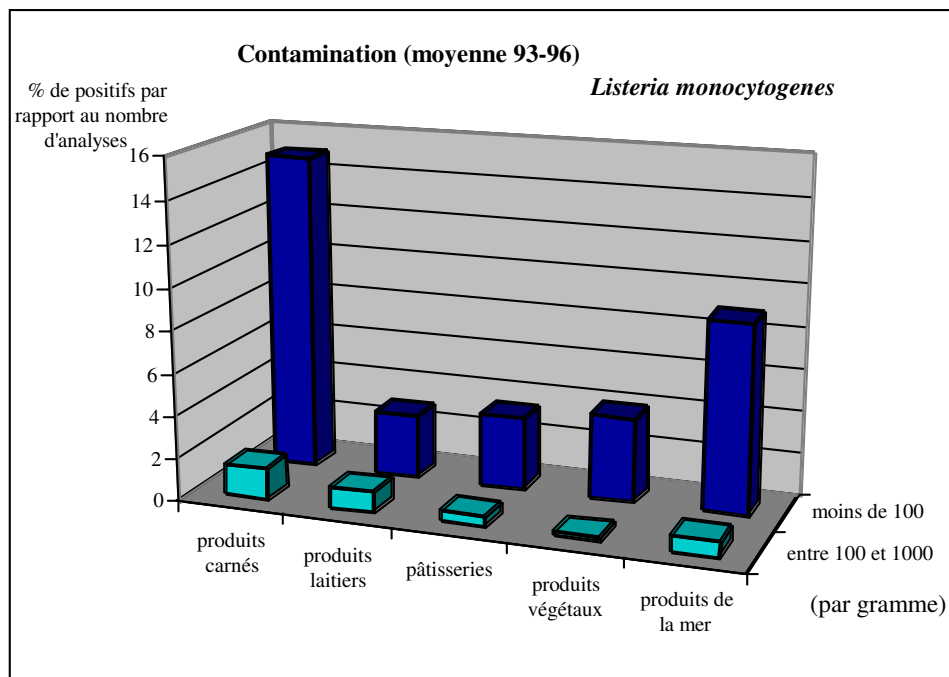
Deux épidémies de listériose ont été attribuées à la consommation de **salade** et **choux** dont le niveau de contamination était inférieur à 100 / g.

La présence de cette bactérie a été détectée essentiellement dans du **lait** ou dans des **produits laitiers** non ou mal pasteurisés (elle survit à la pasteurisation dans certaines conditions de milieu), dans des **produits carnés** (saucisses, langue de bœuf, rillettes, saumon fumé etc).

Parmi les **produits carnés**, les viandes crues sont très souvent contaminées par *Listeria*, leur nombre restant néanmoins faible. Il semble très difficile d'empêcher leur présence occasionnelle. Parmi les produits de charcuterie, ce sont les produits crus destinés à être cuits ou les produits soumis à une maturation / dessiccation (saucissons secs) qui sont les plus à même de contenir des germes : leur contamination est faible et semble ne pas poser problème en santé publique.

La contamination des produits cuits consommés en l'état (rillettes, pâté, produits en gelée) est aujourd'hui très alarmante. Des **post-contaminations** ou une résistance thermique apparente du germe dans ces milieux riches en graisse peut être en partie à l'origine de cet état de fait.

La présence de *Listeria* dans **le lait cru** a été décrite très fréquemment. Entre 1 à 10 % des laits seraient contaminés soit par contamination mammaire liée à une mammité à *Listeria* (peu fréquente et générant des charges microbiennes très importantes dans le lait) soit par des voies indirectes (ensilages, eaux, féces). Dans ce dernier cas, la charge microbienne est faible et une pasteurisation correcte suffit à détruire les germes présents.



Dans les **fromages** frais, les pâtes molles acides, les fromages durs à affinage très long ou des fromages comportant une étape de thermisation, les *Listeria* sont détruites « lentement ».

Les pâtes pressées (bleus) inhibent la croissance de cette bactérie.

Dans les fromages à pâte molle affinée, à croûte lavée ou à croûte fleurie, cette bactérie peut se développer en fonction du pH.

Dans les fromages au lait cru, l'évolution est variable. Certaines flores associées de par leurs bactériocines retardent ou empêchent le développement de cette bactérie.

Dans les **poissons** et **coquillages frais**, l'incidence de cette bactérie n'est pas bien connue. Pour les poissons fumés, il apparaît qu'environ 30 % des produits sont contaminés à un niveau souvent inférieur à 100 / g. Des charges microbiennes élevées sont associées aux produits les moins fumés ou les moins salés. Le saumon tranché est potentiellement susceptible de contenir cette bactérie.

Ce germe est capable de **survivre** longtemps dans des **conditions défavorables** (matériels, sols, végétaux, etc.) et son caractère psychrophile le rend particulièrement dangereux dans les produits réfrigérés. Ce germe peut cultiver dans des produits assurant ses besoins nutritionnels entre pH 5 et 9,5. Dans des fromages à des pH voisins de 5 sa survie dépasse 1 an.

Halophile *Listeria* cultive dans des milieux salés à 10 %. Son caractère sel-tolérant lui permet par exemple de survivre plus de 100 jours à 4°C dans un milieu salé à 30,5 %, mais si la température est remontée à 37°C sa survie n'est que de 5 jours. Dans le fourrage et dans la paille sa survie est de l'ordre de 6 mois. Dans les matières fécales sèches sa survie dépasse deux ans.

La survie de la bactérie est d'autant plus longue que la température est basse.

L'oxydation biologique liée au traitement des eaux usées favorise la croissance de cette bactérie. La charge des boues en sortie de station atteint souvent plus de 10⁴ germes / ml.

D'autres espèces hémolytiques (*L. seelegeri*, *L. ivanovii*) sont aussi pathogènes mais à un degré moindre.

I) Caractéristiques de « survie » de *Listeria*

Froid

1) Survie

La bactérie survit très bien de nombreuses semaines, voire plus d'une année, à -18°C dans des produits très variés (beurre, viande, poulet, lait UHT, etc). Dans ces conditions, son taux de mortalité est faible. Sur du poisson emballé sous vide et entreposé dans la glace, aucune croissance n'est observée, tandis qu'à -20°C leur nombre diminue de 90 % en trois mois.

Dans des milieux de culture acides sa survie à l'état congelé n'est pas très grande.

2) Croissance

La température limite inférieure de croissance de *L. monocytogenes* dans des aliments « riches » et stériles à pH neutre se situe aux environs de 0°C . Dans ces conditions le temps de génération est d'environ une centaine d'heures.

La durée de la phase de latence (mais pas le temps de génération) est fonction de la température à laquelle la bactérie a préalablement cultivé. Le temps de latence est de 13 à 33 jours à 0°C quand la bactérie est issue d'une culture à 30°C . Par contre si laide et entreposé dans la glace pendant 21 jours, le nombre de germes n'augmente pas. culture a été réalisée à 4°C , le temps de latence à 0°C n'est que de 3 à 18 jours.

Dans des produits carnés et en présence d'autres microorganismes avec lesquels *L. monocytogenes* est en compétition et pour des pH voisins de 5,7 *L. monocytogenes* ne se multiplie généralement pas ou très peu à 40°C . Par contre, dans la viande stérile entreposée à 4°C ou dans des pièces de viande découpées et placées à 20°C , la bactérie cultive très bien.

Une croissance à $4 - 4,4^{\circ}\text{C}$ a été décrite dans des œufs liquides pasteurisés et dans de nombreux produits carnés sous-vide.

Dans le blanc d'œuf frais liquide *L. monocytogenes* meurt rapidement aussi bien à 4 qu'à 20°C .

La phase de latence et le taux de croissance sont réduits si la température d'entreposage augmente. Par exemple, le temps de génération et la phase de latence dans un bouillon de poule sont respectivement de 19 h et 2 jours à 5°C et de 9 h et 1 jour à $7,5^{\circ}\text{C}$.

Certains facteurs comme le pH, la concentration en sels, la présence de bactéries lactiques en particulier celles excréant des bactériocines.

Chaleur

Il n'est pas rare de lire : « Tué en 1 heure à 55°C » : cette donnée n'est pas satisfaisante car les paramètres de la destruction thermique sont à considérer dans leur ensemble.

Le germe est plus résistant au chauffage que la plupart des microorganismes asporulés. Une pasteurisation correcte (75°C , 15 sec) suffit à ramener sa probabilité de survie à un niveau très faible à partir de charges microbiennes de l'ordre de 10^6 UFC / ml de lait. En position de parasite intracellulaire elle présente une résistance apparente élevée. Par ailleurs la nature de l'aliment, et plus particulièrement pour des teneurs élevées en lipides (et à un degré moindre en protéines), tend à protéger les souches les plus thermorésistantes. La valeur de D (coefficient de réduction décimale) est relativement élevée dans les viandes, les graisses et les salamis. Aux environs de 50°C les valeurs de réduction décimale sont comprises entre 60 et 25 min et aux environs de 55°C entre 4 et 20 minutes ; et au-dessus de 57°C , ces valeurs sont de l'ordre de 5 min. A 63°C les valeurs de D sont comprises entre 30 et 120 sec. A 69°C ces

valeurs sont de l'ordre de 3 sec et à 75°C de l'ordre de 1,5 sec. Les contaminants ayant cultivé à basse température donnent des cellules à résistance thermique faible. La résistance à la chaleur est accrue par un choc thermique appliqué juste avant le chauffage ou par culture à des températures élevées. A des pH inférieur au pH optimal de croissance, la résistance à la chaleur diminue. Par exemple $D_{52^{\circ}\text{C}}$ dans un jus à pH 4,6 est de 10 minutes ; à pH 5,6 $D_{52^{\circ}\text{C}}$ devient égal à 25 minutes. Des teneurs élevées en solutés augmentent la thermorésistance.

Irradiation

Cette bactérie montre une résistance au rayonnement γ voisine de celle des bactéries Gram +. Les valeurs de D sont de 0,5 kGy en bouillon et de 0,8 kGy dans la viande, 2 kGy dans les crèmes glacées à -78°C . Un traitement à 2,5 kGy de viandes contaminées réduit la charge mais n'élimine pas complètement la bactérie (*L. innocua* est éliminée mais pas *L. monocytogenes* : donc *L. innocua* n'est pas un bon modèle pour étudier la survie). Il semble que *L. monocytogenes* soit moins résistant aux UV que la plupart des autres bactéries Gram +. Les cellules sèches sont 4 fois plus résistantes que les cellules humides.

L'irradiation UV avec une dose de 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ se traduit par une diminution de la charge avec un D égal à 20 sec en milieu humide et de 45 sec en milieu sec. Une dose de 500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ se traduit par une diminution avec D = 5 sec en milieu humide.

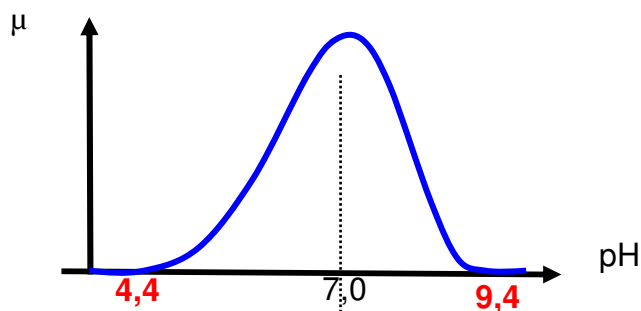
Activité de l'eau

L. monocytogenes présente une activité de l'eau limite de croissance de 0,90 à 30°C quand le glycérol est utilisé pour atteindre cette valeur d' a_w . Les valeurs limites sont de 0,92 et 0,93s pour atteindre ces valeurs avec respectivement le NaCl et le saccharose. Dans les produits carnés la valeur limite pour la croissance est égale à 0,93 à 20°C . Dans des conditions de faible a_w et à basse température, un effet bactériostatique apparaît. Les solutés sont mieux tolérés à $15-30^{\circ}\text{C}$.

L. monocytogenes survit 40 jours à 25°C dans une soupe de poisson à teneur en eau très faible (2%).

pH

L. monocytogenes cultive dans une très grande gamme de pH entre 9,4 et 4,4 ; le taux de croissance étant par ailleurs fonction de la composition et de la température du milieu.



En milieu TSB, les temps de génération sont de 180 min à pH 9,2, de 146 min à pH 9, de 50 min à pH 8, de 44 min à pH 7, de 52 min à pH 6 et de 370 min à pH 4,7. Au-dessous de pH 4 le nombre de microorganismes tend généralement à diminuer.

Désinfectants

En l'absence de matière organique de nombreux désinfectants sont actifs sur la bactérie : hypochlorite de sodium, peroxydes, ammonium quaternaires (100 ppm), iode (20 ppm). L'hypochlorite est inactivé par la matière organique et la décontamination des produits végétaux requiert au moins 200 ppm de chlore actif. *L. monocytogenes* est plus résistante aux désinfectants sur les surfaces sèches qu'en milieu humide.

En milieu aqueux, pH 7 et à 25°C , l'évolution de D en présence d'hypochlorite de sodium est la suivante :

| ppm | D (sec) |
|-----|----------------------|
| 0,5 | 62 |
| 1 | 11 |
| 2 | 7 |
| 5 | 5 |
| 10 | 4 |
| 100 | Réduction > 99,999 % |

Atmosphère

La croissance de la bactérie est peu affectée par l'atmosphère dans laquelle elle se trouve. Des temps de génération identiques sont observées en aérobiose, en anaérobiose ou encore en conditions microaérophile. Le CO₂ exerce un effet inhibiteur à basse température. A des pressions comprises entre 3000 et 4000 atmosphères la valeur de D est comprise entre 100 et 10 minutes.

Interactions

L. monocytogenes est peu affectée par la nature de l'atmosphère (conditions aérobie, microaérophile ou anaérobie). De hautes teneurs en CO₂ n'exercent un effet inhibiteur qu'à basse température.

Dans le tableau ci-après sont indiquées quelques données concernant la croissance de cette bactérie dans des aliments.

| Aliment | Température °C | Croissance (t _d) | Phase latence | pH | A _w , autre | Pré-traitement |
|------------------------------|----------------|------------------------------|---------------|-----|--------------------------|----------------|
| Bœuf | 0 | 6 jours | | 6,0 | | 10°C, 3j |
| Lait cru | 4 | 24 h | | | | |
| Lait entier | 13 | 5 h | | | | |
| Lait UHT | 0 | 77 h | 5-10 j | 6,6 | | 30°C, 48h |
| Lait UHT | 2,5 | 24 h | 2-5 j | 6,6 | | |
| Lait UHT | 5 | 20 h | 1-2j | 6,6 | | 30°C, 48h |
| Lait UHT | 7,5 | 10 h | <1j | 6,6 | | 30°C, 48h |
| Lait UHT | 9,5 | 6 h | <1 j | 6,6 | | 30°C, 48h |
| Lait UHT | 0 | 77 h | 5-10 j | 6,6 | | 30°C, 48h |
| Lasagne | 4 | 24 h | | 5,8 | 0,99 | 37°C, 24 h |
| Pâté en croûte | 8 | 48 h | | | 0,99 | 37°C, 24 h |
| Crème salée | 4 | 48 h | | 6,2 | 6% sel | 35°C, 24 h |
| Foie | 4 | Survie > 40j | | 5,5 | présence flore naturelle | 35°C, 24 h |
| Blanc œuf liquide pasteurisé | 4 | 24-50 h | | | | 35°C, 18 h |
| Blanc œuf liquide pasteurisé | 10 | 8 h | | | | |
| Blanc œuf liquide pasteurisé | 20 | 5 h | | | | |
| Jaune d'œuf cru | 5 | 19 h | 7 j | | | 35°C, 24 h |
| Lait de soja | 5 | 1,6 j | 3 j | | | 35°C, 24 h |
| Lait de soja | 22 | 1,3 h | 4 h | | | 35°C, 24 h |
| Aliment animaux | 5 | 15-30 h | 45-90 h | | | |

Entre pH 5 et 5,5, l'effet bactériostatique du benzoate de sodium n'apparaît qu'au dessus de 0,3 %. Le sorbate de potassium exerce un effet microbicide à partir de 0,2 % (selon les conditions).

La **bactériocine PA-1** présente une concentration minima inhibitrice à partir de 55 U / ml (à 4°C). La présence de bactéries lactiques comme *Str. cremoris* ou *Str. thermophilus* peut inhiber la croissance de *Listeria*.

Le butylhydroxyanisole, le méthylparaben, les acides coumarique, férulique, caféique, gallique et tannique manifestent des concentration minima inhibitrice à partir de 500 µg / ml (à 35°C).

Depuis 1993 un plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments à la distribution a été mis en place. Ce plan renouvelé chaque année concerne la moitié des régions métropolitaines. Environ 4500 prélèvements de 25 g sont réalisés chaque année dans le cadre du plan. Les résultats obtenus sur une période de 4 années permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Les produits artisanaux sont plus contaminés que les produits « industriels »
- Quand les produits sont déballés, leur probabilité de contamination augmente
- Les produits distribués en Grande Surface ne présentent pas de contamination différente de celle des produits présents en magasins traditionnels
- Dans les grandes surfaces, les pratiques dans les rayons à la coupe sont susceptibles d'augmenter la contamination par la bactérie
- Dans les magasins traditionnels, avant même leur déballage, les produits destinés au rayon traditionnel sont plus contaminés que ceux vendus en libre-service
- La grande majorité des produits contaminés (90%) contiennent moins de 100 *Listeria monocytogenes* par gramme.

Ces résultats montrent que la contamination des produits n'évolue pas dans le temps et conforte l'idée que *Listeria monocytogenes* restera un problème important en hygiène alimentaire dans l'avenir immédiat, notamment pour un certain nombre de produits fragiles. Pour les quatre années (93 à 96) les résultats de ces analyses par aliment

m) *L. monocytogenes* dans les ateliers de transformation et en distribution

Le microorganisme colonise très facilement les surfaces froides, humides et souillées. A partir de ce **biofilm « négatif »** les (re)contaminations dépendront de la conception des ateliers (séparation secteur cru – secteur cuit, flux des matières premières, matériels et personnels), de la conception du matériel, des opérations technologiques réalisées, de l'efficacité du nettoyage, de la formation du personnel, de la nature et sensibilité des produits fabriqués et de l'importance des manipulations (tranchage, augmentation des surfaces de contact), et de plus en plus de la mise en place de plans de surveillance (ligne et environnement) au moyen du système HACCP.

C'est à partir de 1992 que le rôle de la distribution dans la multiplication et de propagation des *Listeria monocytogenes* a été mis en évidence. Les produits sensibles doivent impérativement être conservés sous régime de froid (pas de rupture). Souvent les températures de transport, des chambres froides et des comptoirs réfrigérés sont trop élevées.

Des contaminations croisées sont observées au niveau des étals de charcuterie et de fromagerie à la coupe. Les réfrigérateurs ménagers n'étant pas équipés de thermomètres et leur désinfection n'étant que rarissime, ils sont potentiellement des lieux de multiplication et de propagation

n) Critères microbiologiques

Germe ubiquitaire, il est aujourd'hui pratiquement impossible d'obtenir une absence totale de cette bactérie dans les aliments à moins de les soumettre à un traitement antimicrobien après conditionnement ou avant conditionnement aseptique : dans ce cas l'absence de *L.monocytogenes* dans 25 g est le critère logique.

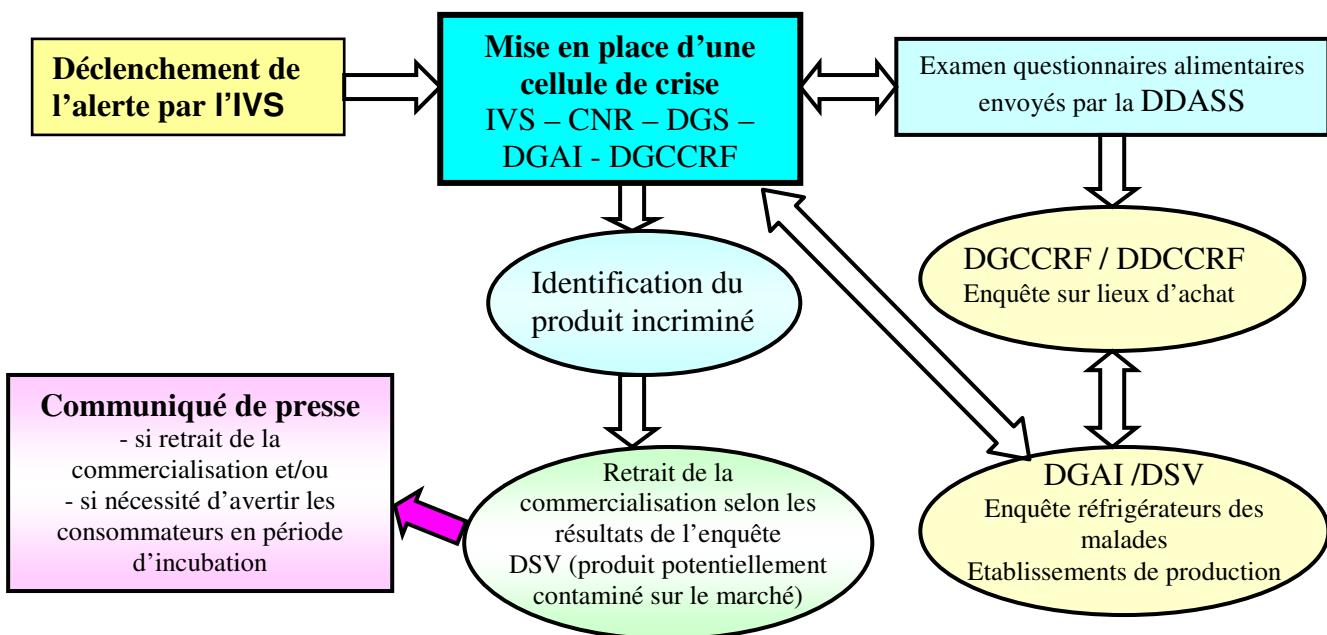
Cette absence de germe dans 25 g doit être un objectif systématiquement recherché.

Néanmoins, pour les produits crus ou pour les produits soumis à un traitement thermique avant conditionnement, il est raisonnable de tolérer un petit nombre de ces bactéries (inférieur à 100 / g).

o) Alertes sanitaires

Un réseau d'épidémiologie-surveillance est depuis peu en place. Quand un malade est atteint de listériose, une déclaration par l'hôpital où est soigné le malade est obligatoire auprès de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS). La *Listeria* est transmise au Centre National de Référence (CNR) des *Listeria* (Institut Pasteur) qui détermine le sérovar, le lysovar et le pulsotype. Un foyer épidémique est déclaré quand 3 personnes au moins sont infectées par la même souche.

Dans le même temps, l'Institut de Veille Sanitaire (IVS) fait procéder à un complément d'enquête sur les habitudes alimentaires des patients par les DDASS. Les Administrations chargées des dossiers que sont la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), la Direction Générale de la Santé (DGS), la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) ainsi que l'Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) sont informées de la situation.



Quand un risque sanitaire est confirmé, il devient obligatoire de retirer les produits incriminés encore en circulation et d'informer les consommateurs du risque lié à la consommation de ces produits qu'ils sont susceptibles de détenir chez eux.

p) Les mesures correctives

- retrait par le professionnel du lot ou de toute la production en circulation dans les filières de distribution
- rappel du produit sous le contrôle des services officiels avec information du consommateur par l'administration
- application des mesures correctives dans l'établissement producteur concerné
- éventuellement décision de fermeture de l'entreprise par l'administration (au moins temporairement) en vue d'un nettoyage ou d'une désinfection approfondis.

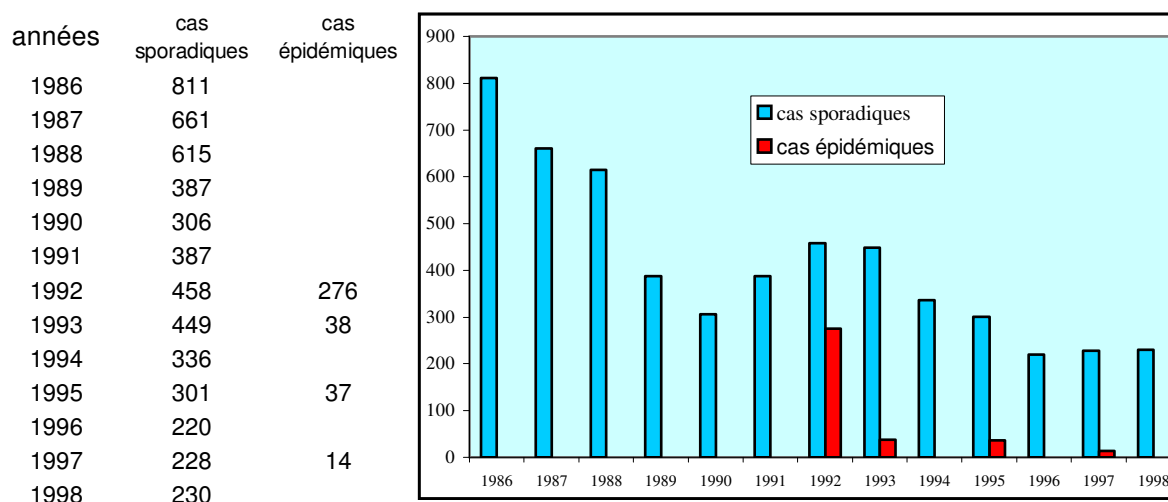
La cellule de crise qui regroupe l'IVS, l'Institut Pasteur, la DGS, la DGCCRF, la DGAL, l'AFSSA se réunit et ajuste les mesures à prendre en fonction des résultats de l'enquête. Si l'entreprise avait été fermée, les modalités de réouverture sont fixées dans le cadre de discussion concertée.

Une information de nos partenaires européens est prévue si le produit a été diffusé dans les pays membres de la CEE.

Dans le tableau ci-après figurent quelques données, forcément sous-estimées, transmises par les services vétérinaires à la DGAL. Ainsi le nombre de foyers de TIAC oscille entre 400 et 500 par an et touche environ entre 7000 et 10 000 personnes. Les TIA à *Salmonella* restent les plus nombreuses (déclarées) et augmentent en ce qui concerne les foyers familiaux.

| | 1998 | 1999 |
|-------------------------------|------|------|
| Nombre de foyers | 381 | 409 |
| Nombre de malades | 5587 | 5924 |
| Nombre d'hospitalisés | 695 | 329 |
| <i>Salmonella</i> | 105 | 83 |
| <i>Staphylococcus</i> | 62 | 60 |
| Anaérobies sulfite réducteurs | 13 | 17 |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 4 | 1 |
| Histamine | 12 | 19 |
| <i>Dynophysis</i> | 1 | 5 |
| <i>Campylobacter</i> | 0 | 2 |
| Autre | 12 | 4 |
| Inconnu | 172 | 218 |

L'incidence de la *Listeria* rapportée par la DGAL entre 1986 et 1998 est reportée sur la figure suivante :



Conclusion

Listeria monocytogenes est un germe « à problème » en hygiène alimentaire. Sa très large distribution dans la nature rend illusoire son éradication. Il faut donc diminuer et maîtriser les sources de contamination, intégrer la maîtrise du risque à toute la chaîne de production (de la matière première au consommateur). Tous les acteurs de la filière agro-alimentaire sont concernés. Les consommateurs doivent être informés du risque lié à la consommation de certains produits à probabilité de contamination élevée (femmes enceintes, personnes âgées, malades etc). Le système HACCP doit être constamment sollicité pour mettre en place des démarches et systèmes de contrôle, de nettoyage et de désinfection avec la plus grande efficacité.

Les aliments sont classés en 4 catégories :

- 1) les aliments crus
- 2) les aliments crus chauffés dans des conditions non listéricides (saucisses fermentées, fromages au lait cru..)
- 3) les aliments traités listéricidiquement mais recontaminés fromages, viandes tranchées etc)
- 4) les aliments traités listéricidiquement par chauffage puis emballés

les consommateurs sont généralement résistants à la plupart des souches de *Listeria* rencontrées dans les aliments. Le guide suivant est proposé pour maîtriser le risque :

- 1) éviter de consommer des aliments crus (fromages au lait cru, poissons fumés, coquillages crus, tarama, surimi etc) ou mal cuits. Préférer le lait pasteurisé, UHT, les fromages pasteurisés, ceux à pâte cuite comme le gruyère, les fromages fondus. Eviter de consommer des graines de soja germées. Il est aussi conseillé d'éliminer la croûte des fromages, de laver les légumes
- 2) éviter les contaminations croisées entre aliments crus et cuits au cours de la préparation et du stockage. Après manipulation d'aliments crus, se laver les mains et nettoyer des ustensiles qui ont été en contact avec ces aliments. La contamination peut également provenir de l'environnement du produit alimentaire. La bactérie est ubiquitaire et les aliments peuvent être contaminés par contact avec leur environnement..
- 3) recuire et / ou réchauffer les aliments. Respecter scrupuleusement les règles habituelles d'hygiène : les restes et les plats cuisinés doivent être réchauffés efficacement avant consommation. *Listeria* peut contaminer des produits qui subissent une cuisson lors de leur fabrication : il s'agit pour l'essentiel des produits de charcuterie (abats, aliments en gelée, rillettes). Laisser les micro-ondes pénétrer dans le produit. Il est recommandé de bien cuire les aliments crus d'origine animale ; les steaks hachés doivent être cuits à cœur
- 4) éviter les pâtés et les fromages affinés ou non (Camembert, Brie). Le risque lié à la consommation des fromages frais est réduit.
- 5) les végétaux crus (légumes, herbes aromatiques) doivent être lavés avant consommation.
- 6) la DLC doit être respectée
- 7) les aliments doivent être préparés en suivant les recommandations des fournisseurs
- 8) maintenir le réfrigérateur propre ainsi que le plan de travail (désinfection avec l'hypochlorite de sodium)
- 9) entreposer les produits périssables dans la zone la plus froide du réfrigérateur ($t^{\circ} < 5^{\circ}\text{C}$)
- 10) éviter de garder des aliments périssables plus de 3 jours au frigo.

III - 5 - 4. *Escherichia coli*

E.coli est un hôte normal de l'intestin de l'homme, dans les fèces son nombre est voisin de 10^6 - 10^7 par gramme. Certains types d'*Escherichia coli* peuvent provoquer des troubles digestifs : ce sont les *Escherichia coli* entéropathogènes. Leur implication a été démontrée dans certaines gastro-entérites, notamment dans les diarrhées infantiles et dans la “**diarrhée des voyageurs**” ou « turista ».

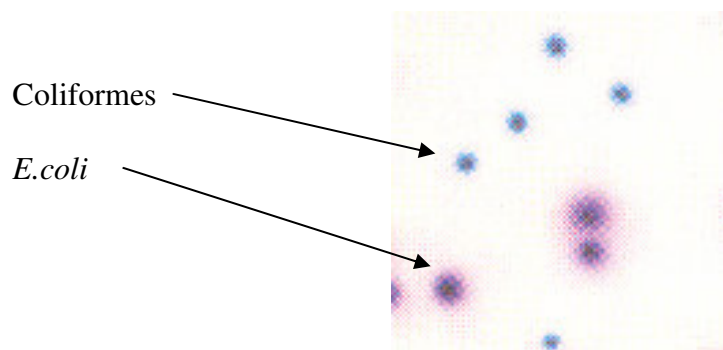
Si les *Escherichia coli* des diarrhées infantiles (*Escherichia coli* G.E.I.) étaient bien connus depuis 1940, ce n'est qu'une trentaine d'années plus tard qu'ils seront reconnus responsables de diarrhées sévères et de toxi-infections chez l'homme. Deux types de souches sont actuellement décrites : d'une part des souches entérotoxigènes capables d'excréter soit une entérotoxine thermostable (fraction ST), soit une entérotoxine thermolabile (fraction LT) ; ces germes doivent, pour manifester leur pouvoir pathogène posséder des structures d'adhérence de type pili dont la production est codée par une plasmide (CFA I et II). D'autre part, il existe des souches invasives provoquant des diarrhées aiguës, avec fièvre, myalgies et frissons. Parmi les sérotypes, les plus souvent responsables de cette maladie, on peut signaler O 25, O 27, O 111, O 115, O 124, O 157. Ces bactéries envahissent les cellules épithéliales du colon et provoquent une diarrhée ressemblant à une shigellose. Des complications au niveau du tractus urinaire sont parfois associées à cette TIA.

E.coli **O157:H7** isolé à partir de nombreux produits alimentaires provoque une colite hémorragique sévère. Cet *E. coli* **vérotoxigène** a été trouvé dans la viande mal cuite et certains produits laitiers. Depuis une dizaine d'années un nombre croissant d'épidémies ou endémies associées à des *Escherichia coli* vérotoxigènes est décrit en Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada) et en Grande Bretagne. Dans un village de ce pays la bactérie a été à l'origine d'une vingtaine de cas dont certains mortels par suite de consommation de viande issue d'une même boucherie. Le sérotype O157 :H7 y est fréquemment identifié et on estime à plus de 20000 par an le nombre de personnes contaminées dans ces trois pays. Au Japon une épidémie a affecté 10000 personnes durant l'été 1996 ; elle a fait plus de 10 victimes.

La recherche de ces bactéries passe par leur isolement suivi d'un sérotypage « classique » par agglutination sur lame.

Les milieux d'isolement font aujourd'hui appel à la mise en évidence simultanée d'activités enzymatiques (β -D glucuronidase et β -D galactosidase) à partir de substrat adaptés libérant au cours de leur hydrolyse un composé chromogène. *E. coli* possède à 44°C ces deux activités.

Les réponses obtenues sur le milieu Rapid *E.coli* de Biorad à 44°C sont présentées ci-dessous :



III - 5 - 5. *Yersinia enterocolytica*

L'infection causée par cette bactérie est qualifiée de yersiniose : la forme la plus commune est une gastro-entérite et ce sont les enfants qui sont plus sévèrement affectés avec des douleurs abdominales intenses, diarrhée, vomissement et fièvre (pseudo-appendicite). Des syndromes plus sérieux comme une septicémie, une méningite, une polyarthrite ou une adénite, peuvent subvenir. La mortalité reste rare et les signes cliniques disparaissent généralement au bout de 48 heures. Le plus souvent ce sont des aliments, et en particulier le lait, les produits laitiers, les coquillages, les viandes et les volailles qui sont impliqués dans cette maladie. Seules certaines souches sont pathogènes. Ce microorganisme psychrophile est très sensible à la chaleur et est facilement détruit par cuisson ou pasteurisation. Dans un milieu entreposé à 7°C, une centaine de cellules contaminantes donnent après 10 jours 10^7 germes par g.

III - 5 - 6. *Campylobacter jejuni* (ou *Vibrio fetus*)

La campylobactériose est une maladie d'origine alimentaire très répandue. Aux Etats-Unis, cette maladie est plus fréquente que salmonellose et shigellose réunies. Les symptômes vont de l'entérite insignifiante à l'entérocolite grave associée parfois à une méningite ou une arthrite. Cette infection d'une durée moyenne de 2 à 3 jours peut parfois persister plusieurs semaines.

Cette bactérie est un hôte intestinal normal de très nombreux animaux ; dans les fèces de poulet ou de dinde il n'est pas rare d'en rencontrer plus de 10^6 par gramme. Ainsi environ 30 % des volailles non cuites, et jusqu'à 10 % des viandes crues sont contaminées par ce germe ou par *Campylobacter coli*. De la sorte, ce sont des aliments d'origine animale mal cuits qui sont le plus souvent mis en cause dans l'infection humaine. Ce genre sensible aux traitements thermiques ne se multiplie pas en dessous de 30°C.

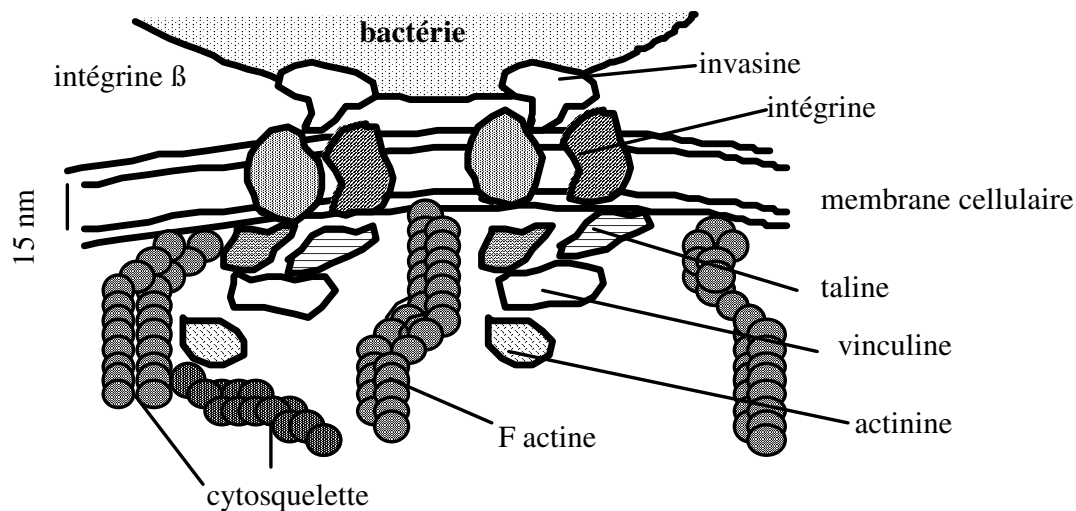
III - 5 - 7. *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*

Leur fréquence de contribution aux maladies liées à la consommation d'aliments est respectivement de 2, 31, 3 et 65 %. Dans le Sud Est asiatique il se produit plusieurs millions de cas par an de dysenterie bacillaire avec environ 1 million de décès par an, alors que 500 000 cas sont répertoriés aux USA avec 5000 décès. La dose infectante est de quelques dizaines de cellules et l'eau reste le vecteur primaire.

Shigella dysenteriae est un hôte de l'intestin de l'homme et des primates. Elle provoque une maladie infectieuse caractérisée par une invasion de la muqueuse du colon sans atteinte du tissu sous-muqueux. Deux entérotoxines sont excrétées par *Shigella dysenteriae* et *S. flexneri*, ces toxines étant cytotoxiques pour l'entérocyte.

Les différentes étapes de cette physiopathologie sont bien connues :

- 1) **adhésion** : reconnaissance de structures entérocytaires réceptrices par les **adhésines** microbiennes
- 2) **invasion** : les structures protéiques bactériennes ou **invasines** sont analogues à certaines protéines de surface avec des séquences R-G-D. Parfois c'est une même protéine qui joue ces deux rôles.
- 3) **croissance intracellulaire** : si deux à trois *Shigella* ont pénétré dans une cellule, elles se multiplient sans phase de latence et au bout de 4 heures leur nombre est voisin de 400. A titre de comparaison un phénomène de pénétration de deux *Salmonella typhimurium* ne se traduit, au bout de 5 heures, que par une multiplication intracellulaire aboutissant à la formation de 10 bactéries par cellule.



III - 6. Conclusion

De très nombreuses enquêtes ont été réalisées pour déterminer les causes des maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments, mais aussi pour connaître leur importance et leur coût dans une Société.

Les causes de ces maladies peuvent résulter :

1 - De risques liés à la préparation des produits alimentaires.

A ce niveau il faut signaler que les produits d'origine industrielle qui représentent actuellement la plus grande partie de notre alimentation ne sont que rarement impliqués. Ce sont surtout la restauration et la cuisine familiale qui sont les plus souvent à l'origine de ces maladies. Dans ces conditions, il apparaît que ce sont dans l'ordre : une réfrigération insuffisante, une préparation trop à l'avance, une cuisson insuffisante, des manipulations non hygiéniques par des personnes malades ou porteuses de germes, un réchauffage inadéquat, la présence de produits crus contaminés dans des plats non cuits et le nettoyage insuffisant qui sont responsables de la présence et/ou de la prolifération des microorganismes. Au niveau industriel, la plupart des toxi-infections résultent de la contamination des matières premières ou de défauts de traitements et d'emballage.

2 - De risques liés à la conservation et à l'entreposage.

Parmi les nombreux facteurs qui sont à prendre en considération au cours de cette opération (durée, nature de l'aliment, type de traitement technologique de conservation, activité de l'eau, pH, nature de l'emballage, nature et nombre de microorganismes contaminant), c'est la température qui joue le rôle le plus important. Ainsi, il faut que les produits alimentaires au sein desquels des microorganismes sont susceptibles de se développer soient conservés à des températures pour lesquelles ce développement est ralenti, voire impossible, c'est-à-dire moins de 2°C ou à plus de 60°C. Dans ce dernier cas, il ne peut être envisagé de conservation de longue durée en raison de contraintes technologiques mais aussi en raison de modifications physico-chimiques rapides (réaction de Maillard par exemple) que subit le produit. Quoiqu'il en soit, ces deux températures doivent être appliquées le plus rapidement possible au produit alimentaire qui vient d'être préparé.

Rappelons ici, que parmi les bactéries responsables de toxi-infections, certaines sont capables de se développer à des températures voisines de 10°C, voire de 3 à 4°C (*Yersinia*, *Listeria*). Par ailleurs, dans

ces conditions d'autres germes peuvent être à l'origine d'altérations diverses (*Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*).

L'activité de l'eau de certains types d'aliments, comme les produits déshydratés, leur confère une grande stabilité microbiologique. Il est alors nécessaire d'éviter la réhydratation de ces produits car certains microorganismes pourraient cultiver et dans le cas où il s'agit de levures et moisissures les risques d'apparition de mycotoxines deviennent prépondérants. Il faut enfin signaler que des innovations technologiques comme les emballages sous vide ou de la cuisine sous vide peuvent contribuer, si par exemple les conditions requises de température d'entreposage ne sont pas respectées, à l'augmentation de fréquence d'un type donné de maladie microbienne.

3 - Des nouvelles habitudes alimentaires.

Ces nouvelles habitudes font appel à la cuisine collective, à la consommation de produits crus ou mal cuits, à la consommation de produits « bio », à l'utilisation de plats pré-cuisinés, etc...

Il importe donc que nos aliments tendent de plus en plus vers une excellente qualité microbiologique et plus particulièrement vers une qualité hygiénique irréprochable. Pour ce faire il existe, en plus de l'éducation nécessaire des "cuisiniers domestiques et industriels" mais aussi des consommateurs, des moyens technologiques nombreux et variés : traitements thermiques (pasteurisation, stérilisation), radiations ionisantes, abaissement de l'activité de l'eau, réfrigération, congélation, mode de conditionnement, produits chimiques souvent qualifiés de conservateurs (nitrites, sorbate, acides divers, etc). Par ailleurs, il existe des méthodes d'analyses microbiologiques qui permettent aux industriels de se conformer à la réglementation, d'éviter la contre publicité en cas d'accident, de gérer la qualité en cours de fabrication et enfin de prévenir les intoxications alimentaires. Enfin, il faut signaler que des concepts récents, comme celui du contrôle des points critique ou de l'analyse du risque (méthode HACCP) tendent vers des réalisations de produits alimentaires avec "zéro défaut".

Les démarches fondamentales à satisfaire pour maîtriser les risques liés aux TIAC peuvent être par exemple énoncées de la façon suivante :

| | |
|--|--------------|
| Aliment : contrôle et inspection des matières premières (température, microorganismes, composition etc. en fonction d'un cahier de charges). Lavage éventuel des légumes ou végétaux à consommer crus. | |
| Propreté : nettoyage et désinfection rigoureux, ateliers ou cuisines ordonnés, concept des locaux, surfaces etc., fermables et fermées etc. | poubelles |
| 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 : bon chaud et remontée en température rapide : 1 heure et maintien au moins à 65°C des aliments refroidis et à consommer chauds . La zone tiède (20 - 45°C) est à éviter | cuits |
| Décongélation totale 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 (μondes) | être |
| Organisation : respecter la "marche en avant " : interdire tout croisement entre le circuit sain et le circuit souillé, systématiquement les aliments (conditionnement précoce etc) | protéger |
| Préparation : éviter des préparations de trop grandes quantités qui "attendront" | |
| Assainissement : barèmes de pasteurisation, stérilisation, cuisson adaptés. Utiliser du matériel performant et contrôler de l'efficacité de l'opération | réaliser des |

Directive 93/43/CEE relative à l'hygiène des denrées alimentaires

Arrêté Ministériel du 9 mai 1995 : réglemente l'hygiène des aliments remis directement au consommateur. Système **HACCP** :

- 1) déterminer des sources de dangers éventuels
- 2) identifier parmi les points qui ont été mis en évidence ceux déterminants pour la sécurité des aliments
- 3) définir et mettre en œuvre les moyens de maîtriser ces points
- 4) définir et mettre en œuvre les procédures de suivi efficaces

Le système HACCP est associé à la mise en œuvre de système de gestion de la qualité tels que mentionnés dans les normes de la série ISO 9000.

La directive v93/43/CEE recommande l'élaboration de **Guides de Bonne Pratique** ou encore des démarches **HACCP**

Les Guides de Bonne Pratique (GMP) sont élaborés par les organismes professionnels pour les professionnels (ex syndicat des Pâtisseries pour les pâtisseries) ; il s'agit d'une sorte d'HACCP pour la profession.

Les GMP ont 2 objectifs :

- mettre en place un système proportionné aux risques sanitaires encourus dans le secteur concerné
- responsabiliser les professionnels dans leur démarche de maîtrise des risques.

Les Bonnes Pratiques d'Hygiène comprennent l'entretien des locaux et équipements, le nettoyage, la désinfection, la maîtrise des chaînes du froid et du chaud, l'hygiène du personnel.

Arrêté Ministériel du 3 avril 1996 : stockage en entrepôts

Arrêté Ministériel du 28 mai 1997 : transformation des végétaux

Arrêté Ministériel du 29 septembre 1997 : hygiène dans la restauration sociale

Arrêté Ministériel du 20 juin 1998 : transport des aliments

HYGIENE DES LOCAUX

Par leur concept (dimensions, agencement, etc), les locaux doivent permettre la maîtrise des **Bonnes Pratiques d'Hygiène** ; prévenir la **contamination croisée** entre et pendant les opérations entre denrées, équipements, matériaux, eau, aération, personnel, et source de contaminations extérieures. Deux grands principes :

- 1) **Séparer secteur propre / secteur souillé**. Eviter les circulations d'un secteur à l'autre ; sinon prévoir un sas de nettoyage. Identifier les circuits de personnels.
- 2) **Marche en avant** (locaux et postes de travail permettant une progression continue des opérations). Individualiser les points générateurs de déchets ou sous-produits.
- 3) **Identifier et séparer zone chaude et zone froide**. Identifier les zones avec températures « obligatoires ». Regrouper les zones froides entre elles et idem avec les zones chaudes. Analyser les possibles transferts chaud-froid .
- 4) **Faciliter le nettoyage** (murs lisses, sols antidérapants avec siphons, matériels avec norme NF Hygiène Alimentaire).
- 5) **Assurer la prévention des contaminations** (empêcher pénétration des insectes, assurer l'encadrement des visiteurs, filtrer l'air, etc)

HYGIENE DES DENREES ALIMENTAIRES

L'entreprise doit utiliser des produits sains et protégés (emballés). A l'arrivée : contrôler la température, l'intégrité de l'emballage, l'étiquetage (date limite d'utilisation : DLU)

Eviter les apports microbiens, limiter la prolifération microbienne, éviter la sur-contamination (veiller à la destruction de germes, spores, toxines,...). La prolifération est fonction de la composition, du pH, du rH, de l'**a_w**, de la **température**, de l'HR, de la composition de l'atmosphère).

Respecter la chaîne du chaud (à 65°C et plus : aucun risque jusqu'à consommation si la température reste supérieure à cette valeur : consommation le jour même)

Respecter la chaîne du froid : l'entreposage doit être continu à température constante (0 à +7°C en réfrigération ; -12 à -20°C en congélation)

La réfrigération doit être continue : la rupture de la chaîne du froid entraîne des multiplications de germes.

| Températures °C | Denrées alimentaires |
|-----------------|---|
| 0 à 2 | Poissons, mollusques, crustacés |
| 3 | Viandes découpées, charcuterie, abats, plats cuisinés |
| 4 | Volailles, gibiers, lapins, lait cru |
| 6 | Charcuterie en gros, lait pasteurisé, yaourts, crème non stérilisée, fromages (frais, à pâte molle ou persillée, œufs réfrigérés) |
| 7 | Viandes en carcasses ou en quartiers |
| 10 | Légumes |
| 15 | Fromage à pâte pressée ou cuite |

La congélation suppose du produit une qualité saine et marchande au moment de la congélation, une préparation rapide pour minimiser les modifications (biochimiques, chimiques, organoleptiques, microbiologiques), une mise en œuvre d'un procédé permettant d'atteindre rapidement la température définie, un maintien à cette température (égale ou inférieure à -18°C), être livré au consommateur avec son emballage et étiquetage sans rupture de la chaîne du froid. La congélation de plats cuisinés doit suivre immédiatement leur refroidissement après cuisson.

| Température °C | Denrées alimentaires |
|----------------|---|
| -20 | Glaces, crèmes glacées |
| -18 | Produits d'origine animale, de la pêche, plats cuisinés |
| -14 | Beurre, crèmes |
| -12 | Ovoproduits, abats, lapins, volailles |
| -10 | Viandes |

Des produits restent toujours potentiellement dangereux (œufs et ovoproduits, le lait et produits laitiers, la viande (hachée surtout) et les abats, les volailles, les poissons et produits de la mer et d'eau douce).

HYGIENE DU PERSONNEL

Santé

Eviter les personnels malades (porteurs de germes, lésions cutanées aux mains et avant-bras : port de gants obligatoire). Le risque augmente avec le nombre de manipulations.

Propreté vestimentaire et corporelle

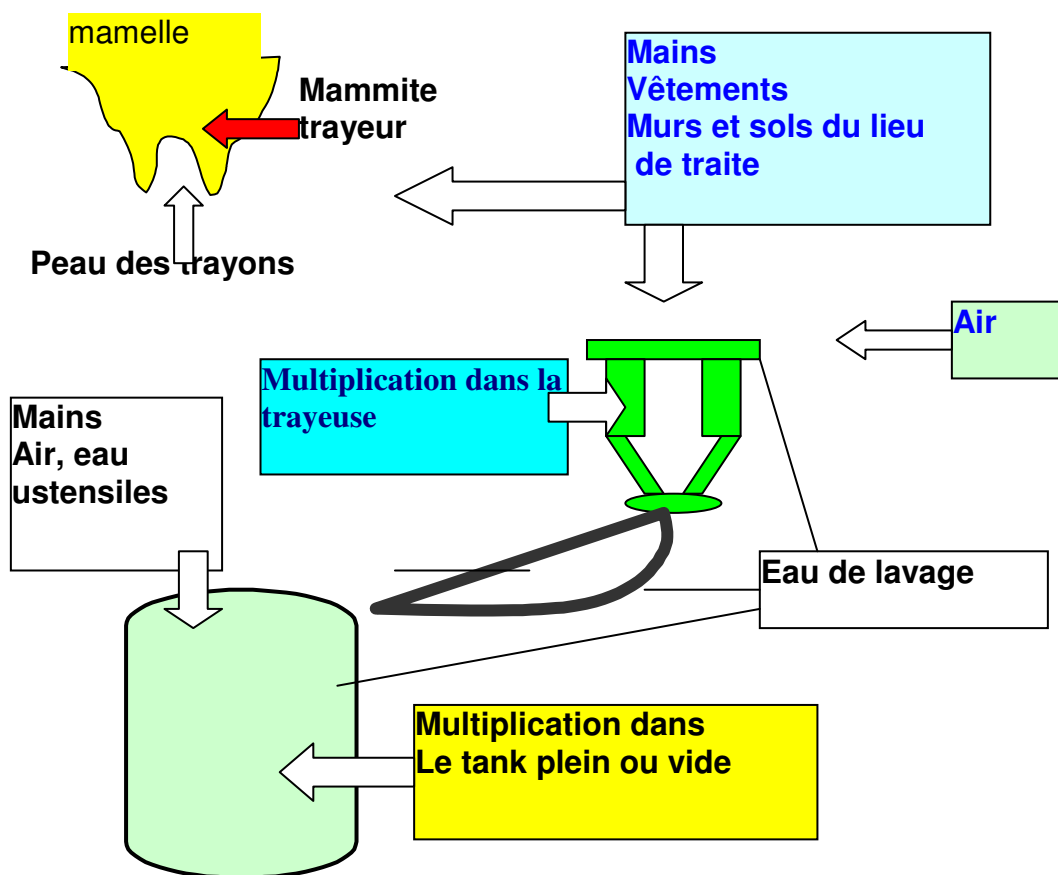
Tenue de travail correcte et vestiaire aménagé (coiffe, calot : *charlotte*, chaussures, bottes ou sur-bottes, vêtements clairs et propres, blouses). Hygiène personnelle nécessaire, lavage régulier des mains et en sortie des toilettes ou après une opération salissante ; prévoir un lave-main à commande non manuelle.

Hygiène comportementale

Eviter les manipulations intempestives, ne pas manger, ne pas fumer, ne pas goûter les aliments avec les mains, éviter les cris et « parlottes » inutiles, éviter les gestes inutiles.

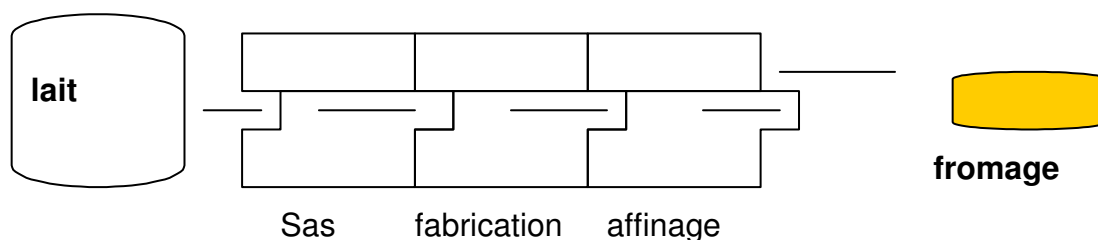
Pour le lait, les contaminations se produisent aux points critiques suivants :

Exemple : la laiterie



Le lait doit être réfrigéré au plus tard 2 heures après la traite à 4°C au maximum. C'est l'entreprise de transformation qui est responsable des points critiques chez le producteur.

Le locaux en fromagerie doivent être fonctionnels et répondre au schéma suivant :



Quelques sites internet utiles en STIA

En France (et pour certains thèmes à l'international)

1) L'**AFSSA** (agence française de sécurité sanitaire des aliments) évalue les risques en s'appuyant sur des comités d'experts. Pierre Besançon (Biotechnologies), Jean-Louis Cuq (Arômes, Additifs, Auxiliaires technologiques), Nathalie Gontard Professeur à l'IUT et ancienne ISIM (Matériaux au contact des denrées alimentaires) en font partie. L'évaluation concerne l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la matière première au consommateur. L'agence n'a pas pouvoir de contrôler directement, les ministères décidant de la réglementation, des autorisations ou interdictions.

<http://www.afssa.fr>

Il existe sur ce site l'organigramme du système français de prévention de l'ESB :

http://www.afssa.fr/dossier_esb.htm

2) La **DGAL** (direction générale de l'alimentation) du Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation s'appuie sur les Services Vétérinaires Départementaux, les Services régionaux de la protection des végétaux, les Directions régionales de l'agriculture et de la forêt. Elle exerce les compétences du ministère pour maîtriser et promouvoir la qualité et la sécurité des productions animales, végétales et alimentaires et pour le bien-être des animaux.

<http://www.agriculture.gouv.fr/accueilv4f.htm>

La DGAL propose des rubriques spécifiques sur des thèmes donnés :

Pour **Listeria** : http://www.agriculture.gouv.fr/alim/secu/listeria/somm_listeria.htm

Pour les **dioxines** : <http://www.agriculture.gouv.fr/actu/enun/dioxinesommaire.html>

3) Les **SVD** (services vétérinaires départementaux) organisent des contrôles permanents ou inopinés, gèrent des plans de surveillance. En conformité avec la norme européenne EN 45004 relative aux organismes d'inspection

<http://www.agriculture.gouv.fr/mini/depa/welcome.html>

4) L'**InVS** (institut de veille sanitaire) du Ministère de la santé a été créé en 1998. Sa mission est de surveiller en permanence l'état de santé de la population française (surveillance épidémiologique, évaluation des risques, observation de la santé) et de suivre son évolution.

<http://www.mps-sante.fr/>

Il existe des bases de données dont les contenus concernent :

- les relations aliments – nutrition – intoxications alimentaires.

<http://www.chu-rouen.fr/ssf/alimentfr.html>

- la sécurité alimentaire en Europe

http://europa.eu.int/comm/food/fs/intro/index_en.html

Le Centre Européen de Prévention des Risques (CEPR)

<http://www.cepr.tm.fr/fr/observatoire/index.asp>

- la sécurité alimentaire des plantes transgéniques

<http://www.cnrs.org/SDV/pascal.html>

<http://www.pasteur.fr/infosci/biblio/actuogm.html>

- l'ESB

<http://www.inra.fr/Internet/Produits/securite-emballage/pagefr.html#>

- Listeria

- avec l'Institut Pasteur de Paris

<http://www.pasteur.fr//infosci/biblio/internet/dossiers/lister.html>

- avec l'Institut Pasteur de Lille

<http://www.pasteur-lille.fr/France/expert/env/sermha/sermha.html>

- la normalisation au travers de l'AFNOR (Ministère de l'industrie)

<http://www.afnor.fr/>

Les normes relatives à l'industrie agro-alimentaire

<http://normessenligne.afnor.fr/cgi->

[bin/normessenligne.storefront/984508681/EXT/RechercheGuidee/0/1914/0](http://normessenligne.storefront/984508681/EXT/RechercheGuidee/0/1914/0)

- la normalisation au travers de l'ISO (International standard Organization)

<http://www.iso.ch/>

Les normes dédiées à l'alimentation sont dans la catégorie 67

<http://www.iso.ch/catf/67.html>

Les normes ISO 9000 et ISO 14000 sont décrites sur le site :

<http://www.iso.ch/9000f/voyage.htm>

- La normalisation au travers du CEN (Comité Européen de Normalisation)

<http://www.cenorm.be/>

Au niveau international

L'**OMS** (organisation mondiale de la santé, WHO) et son programme sécurité des aliments

<http://www.who.int/fsf/>

La **FAO** (Food and Agriculture Organization)

Le Codex Alimentarius (code alimentaire) est la référence mondiale pour les consommateurs, les producteurs de denrées, les organismes nationaux de contrôle et le commerce international des aliments

<http://www.fao.org/docrep/w9114f/w9114f00.htm>

La Commission du codex sera bientôt disponible en français

<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/codex/default.htm>

Evaluation du risque microbiologique dans les aliments :

<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/raexpert.htm>

Aux USA

FDA (Food and Drug Administration) <http://www.fda.gov/hometext.html>

Food Safety and Inspection Service <http://www.fsis.usda.gov/>

The Food Safety Consortium <http://www.uark.edu/depts/fsc/>

Food Safety and Nutrition information <http://ificinfo.health.org/infofsn.htm>

The National Food Safety Database <http://www.foodsafety.org/>

Consumer Food Safety Resource Page <http://foodsafety.wsu.edu/>

IV . Les mycotoxines

De très nombreuses revues et publications sont consacrées à ces molécules. Parmi celles-ci, il est possible de signaler :

- Moisissures Toxiques dans l'Alimentation (1974) - 471 p - Cl. Moreau - Masson Ed., Paris
- Mycotoxins and food safety , Food Technology , may 1986 , 59-66 ,
- Food Technology 1994
- Memorial Symposium on Mycotoxins , JAOCS , 1981 , 927A-1022A

Les mycotoxines de structure chimique très variée sont des exotoxines produites par des champignons inférieurs quand les conditions de croissance sont satisfaites en particulier l'**a**_{eau}, le **pH** et la **température**.

Non contagieuses, elles ne provoquent pas de réaction immunologique chez les malades. Une espèce de moisissure donnée peut synthétiser plusieurs mycotoxines et une mycotoxine donnée peut être synthétisée par plusieurs espèces ou genres de champignons. Par ailleurs, la production de la toxine dépend aussi de la souche. Il existe ainsi des souches toxigènes et d'autres non (60 % des *Aspergillus flavus* sont non toxigènes).

A l'heure actuelle plus de 150 mycotoxines ont été identifiées.

Les mycotoxicoses peuvent être classées selon leur cause (classification étiologique) ou selon leurs syndrômes (classification nosologique). On connaît des hépatotoxicoses, des néphrotoxicoses, des neurotoxicoses, des dermatotoxicoses etc. Il existe aussi des toxines à activité œstrogène ou photosensibilisantes ou encore abortives.

Le métabolisme primaire des moisissures est identique à celui des autres êtres vivants tandis que leur métabolisme secondaire très important et très varié dépend de la souche considérée, ce qui conduit à une grande diversité de mycotoxines.

Les différentes voies de la biosynthèse des mycotoxines sont extrêmement nombreuses. La voie des polycétoacides reste cependant la plus commune .

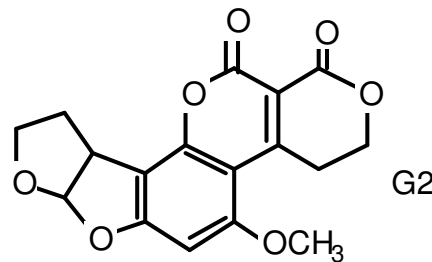
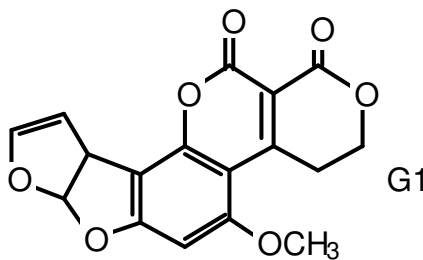
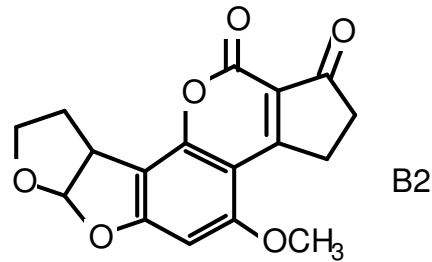
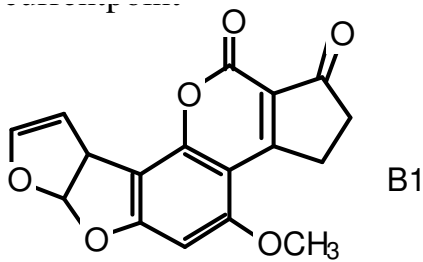
Il est possible de classer les mycotoxines selon la structure de laquelle elles dérivent:

- dérivés du glucose : acide kojique
- dérivés d'acides aminés : acide aspergillique (leu, ile), fumitremorgènes (trp , pro), gliotoxine (phe, ser), roquefortine (trp, his), slafranine (lys), sporidesmines (trp, ala, cys)
- dérivés d'acides aminés et de mévalonate : ergotamine, acide cyclopiazonique
- dérivés des polycétoacides : aflatoxines, acide pénicillique, citrinine, patuline, rubratoxines, stérigmatocystines, zéaralénone
- dérivés des polycétoacides et d'acides aminés : ochratoxine A, cytochalanase, érythroskyrine
- dérivés des terpènes (voie de l'acétate via le mévalonate) : trichothécènes

Les aflatoxines – Historique & Structure

La découverte de la plupart des mycotoxines date des années 60. Ainsi la découverte de l'**aflatoxine** en 1960 en Angleterre est le résultat de l'enquête liée à la mort de 100 000 dindes ayant consommé des graines d'arachide importées d'Afrique. Des aliments soupçonnés fut isolé *Aspergillus flavus* et la toxine produite par le microorganisme a été appelée **A(spergillus) fla(vus) toxine.**

Quatre principales toxines sont actuellement décrites (B1, B2, G1, G2), et certains de leurs dérivés possédant encore un pouvoir toxique se retrouvent dans des produits comme le lait d'animaux ayant consommé des végétaux contaminés (aflatoxines M1 et M2 par exemple).



Il s'agit de coumarines substituées qui sont **hépatocarcinogènes**. Leur toxicité est plus grande chez les mâles que chez les femelles et les effets sont plus importants dans le cas de sous alimentation protéique. Chez le rat mâle la DL₅₀ est, en toxicité aigüe, de 10 mg par kg.

Les effets carcinogéniques résultent d'un effet sur l'ADN (molécules intercalantes) et d'un turn-over hépatique extrêmement lent, ce qui se traduit par une accumulation dans le temps avec, à un moment donné, atteinte d'un seuil déclenchant.

Stabilité & Inactivation

Ces molécules sont insensibles à l'ébullition et un autoclavage de 4 heures à 121°C réduit mais ne détruit pas leur nocivité.

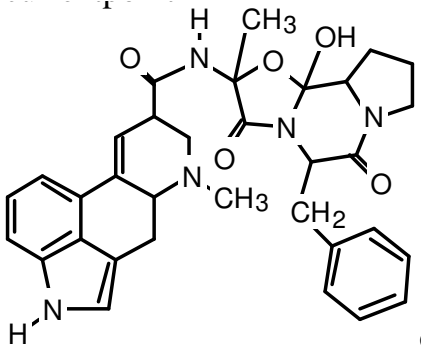
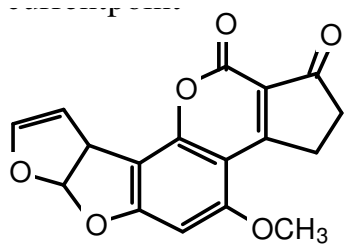
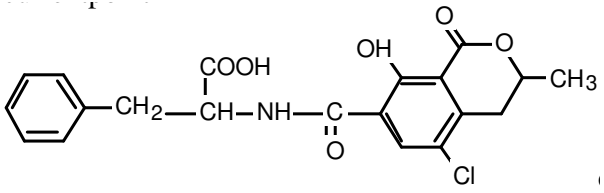
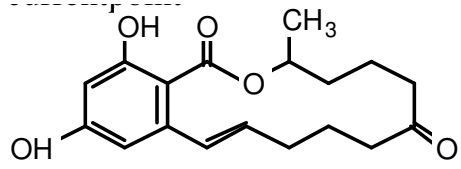
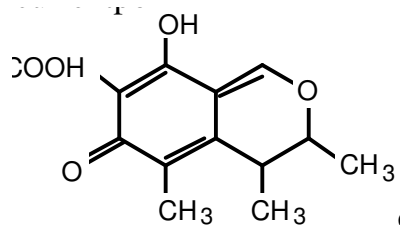
L'hypochlorite de sodium à 5% et les agents oxydants sont à utiliser pour décontaminer les équipements de laboratoire ou industriels. Les traitements alcalins (NH₃ sous pression par exemple) permettent d'inactiver ces toxines par ouverture du pont lactone, les dérivés formés n'étant plus hépatocarcinogènes.

Production

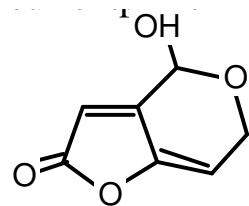
La toxine peut être produite par *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus* dans des graines (riz, soja, coton, arachide, blé, etc.) et dans les produits dont la teneur en eau est supérieure à 15-17% (eau supérieure à 0,75). Sa teneur est généralement inférieure à 5 µg / kg, mais il n'est pas rare de trouver des graines dont la teneur est voisine ou supérieure à 100 µg/kg.

Ces aflatoxines, comme la plupart des autres mycotoxines, sont analysables, après extraction par des solvants, en une dizaine de minutes par HPLC sur des phases stationnaires du type C18 ou par ELISA.

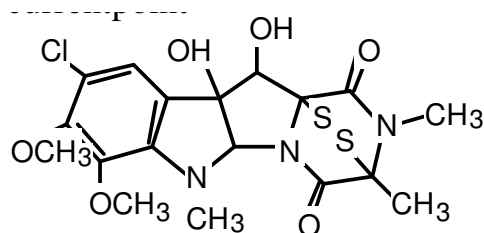
Les principales mycotoxines susceptibles d'être présentes dans les aliments sont indiquées dans le tableau ci-après .

| Mycotoxine | Moississures responsables | Aliment | Syndrômes | formule chimique |
|--------------|--|----------------------|--------------------------------------|--|
| Ergotamine | <i>Claviceps purpurea</i> | seigle | gangrène des extrémités |  |
| Aflatoxines | <i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> | arachide céréales | syndrômes hépatiques |  |
| Ochratoxines | <i>A. ochraceus</i> <i>P. viridicatum</i> | maïs orge | syndrômes hépatiques et rénaux |  |
| Zéaralénone | <i>Fusarium graminearum</i> | maïs aliments | syndrômes oestrogéniques |  |
| Citrinine | <i>P. citrinum</i> | orge seigle | syndrome néphrotique |  |

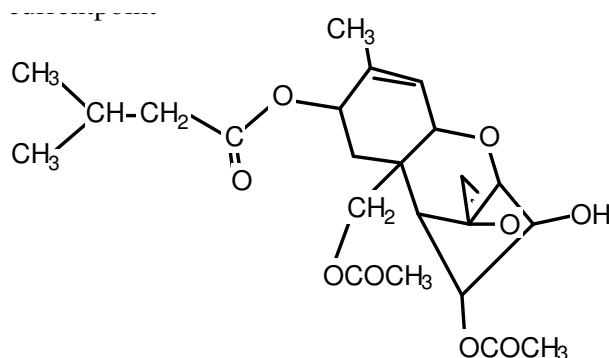
| | | | |
|----------|--|------------------------------|---|
| Patuline | <i>A. clavatus</i> <i>P. expansum</i> <i>P. expansum</i> | pomme jus de pomme blé | neurotrope - syndrome cutané (sarcome de la peau) cancérigène |
|----------|--|------------------------------|---|



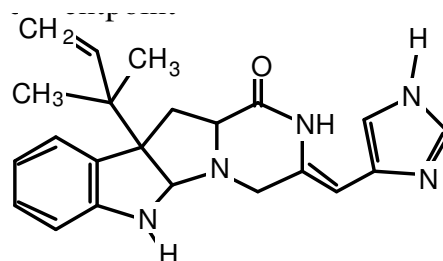
| | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------|---|
| Sporidesmine | <i>Pithomyces</i> <i>chartarum</i> | herbe | eczéma par photosensi- bilisation |
|--------------|---------------------------------------|-------|---|



| | | | |
|-----------|--------------------------------------|----------|------------|
| T2 toxine | <i>Fusarium</i> <i>tricinctum</i> | céréales | leucopénie |
|-----------|--------------------------------------|----------|------------|



| | | | |
|--------------|---|---------|---------------|
| roquefortine | <i>Penicillium</i> <i>roqueforti</i> | Fromage | hépatotoxique |
|--------------|---|---------|---------------|



Parmi les principales autres mycotoxines, il est encore possible de citer :

| <u>mycotoxine</u> | <u>moisissure</u> | <u>signes cliniques</u> |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| émodine | <i>Aspergillus wentii</i> | diarrhée |
| acide kojique | <i>Aspergillus flavus</i> | convulsant |
| fumitremorgène | <i>Aspergillus fumigatus</i> | tremblements |
| lutéoskyrine | <i>Penicillium islandicum</i> | cancérigène |
| époxyoptalone | <i>Penicillium roqueforti</i> | hépatotoxique et néphrotoxique |
| vomitoxine | <i>Fusarium</i> | émétique |
| stérigmatocystine | <i>Aspergillus versicolor</i> | hépatocancérigène |

V . Principales maladies parasitaires transmises par les aliments

Les 8/10 de l'humanité sont atteints de nos jours de parasitose. Un parasite peut être simplement défini comme tout organisme vivant dans sa proie sans la détruire autant que possible. Il existe des parasites facultatifs et des parasites obligatoires de surface ou internes. Généralement les parasites n'ont pas de défense ni de locomotion propres, ni par ailleurs de systèmes de recherche de nourriture : l'infestation d'un nouvel hôte impose une évolution par cycles plus ou moins complexes. Chez l'hôte, le parasite produit des effets toxiques, traumatiques qui sont fonction de leur nombre. Les défenses de l'hôte consistent en des réactions locales (sclérose, granulome) ou en une éosinophilie avec production d'anticorps sériques spécifiques.

Le diagnostic des parasitoses est soit direct (recherche directe du parasite par observation microscopique) soit indirect le plus souvent par des techniques immunologiques ou des techniques dérivées.

Sans entrer dans des détails, il est possible de classer les parasites en :

V - 1 Protozoaires (unicellulaires)

1 . Amibes nues

Amibe dysentérique (Amibiase) est provoquée par *Entamoeba histolytica*
forme **minuta** dans l'intestin → kyste (organe de résistance) → selles

↓

↓

mains

forme **histolytica** (état général faible , pH, etc...) → pénètre dans la muqueuse et se nourrit d'hématies.
Dysenterie amibienne aigüe : faux besoins (40/jours), selles afécales, malade prostré.

Traitement : métrondazole (flagyl).

2 . Flagellés

- **Trichomonose** *Pentatrichomonas hominis* : intestinal
 Trichomonas vaginalis : vaginal

- **Flagellés sanguicoles et tissulaires**

* **Trypanosomoses** (*Trypanosoma brucei*, *T. gambiense*, *T. rhodesiense*) lymph, sang, liquide céphalorachidien : maladie du sommeil.

Hôte intermédiaire : glossine ou mouche tsé tsé.

Signes : fièvre (20 j d'incubation préalables après la piqûre de glossine)

Adénopathies, trypanides (taches sur le corps), céphalées, crampes, insomnies, nerf facial atteint, photophobie. Ensuite hypersomnie

Traitement : avant envahissement du liquide céphalorachidien : Lomidine (IM)

Après envahissement : Arsobal (IV)

* **Leishmanioses** (*Leishmania donovani*, *L. tropica*)

Soit dans les cellules du système réticulo histocytaire, soit de la peau et des muqueuses soit des organes profonds (foie-rate...) où il fait éclater les cellules après division

Hôte intermédiaire : moucheron (phlébotome)

Traitement : glucantime (IM).

3 . Sporozoaires (toujours parasites)

- sang : **Paludisme** (*Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*)

1 milliard de sujets atteints, 1 million de morts/an

Cycle évolutif complexe à 2 hôtes (homme et femelle hématophage d'un moustique du genre anophèle)

Lyse des hématies : fièvre → anémie hémolytique, avec splénomégalie.

Signes : 7 à 10 j d'incubation, puis premier accès (frisson et froid : 1 heure, chaleur, 7 heures; sueurs : 2 heures). Accès séparés de 48 h (tierce) ou 72 h (quarts). t° de 40,5 à 41°C.

Traitement : nivaquine, quinine buccale, lariam

- tissus : **Toxoplasmose** (chat, rat → homme). *Toxoplasma gondii*

La forme enkystée se développe, après 25 ans, chez l'homme dans le cerveau et le tissu musculaire (fièvre - maux de tête - adénites etc...).

Immunologie : la présence de *Toxoplasma* conduit à la formation d'anticorps.

V - 2 - Helminthes

1. Plathelminthes (verts plats)

A. **Trématodes** non segmentés et pourvus de ventouses de fixation . Nombreux sont les trématodes pathogènes pour l'homme .

1. **Douves et schistomatoses de l'intestin** (6 espèces)

2. **Douves et schistomatoses hépatiques** : *Chlonorchis sinensis* (parasite du chien et du chat, du porc) ver de 200 mm de long. Accumulés dans les canaux biliaires → œufs → poisson → muscle du poisson (*Bothinia*) → consommation à l'état cru.

Signes : vomissement, diarrhée, cirrhose.

Traitement : hexachloroparaxylène (chloxyde). Parasite détruit à 50°C env. 15 minutes.

3. **Douves et schistomatoses pulmonaires** : *Paragonimus ringeri*

4. **Schistosoma** et bilharzioses parasites du système veineux

Espèces : *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*

Signes : hématurie, sérologie pour *S. haematobium*

Traitement : Ambilhar (nitrothiamidazole)

S. mansoni : signes intestinaux : diarrhée sanguinolente, coliques, nausées, vomissements, soif.

- B. **Cestodes** à anneaux (segmentés), hermaphrodites, parasites du tube digestif.

Trois formes parasites pour l'homme sont apportées par la consommation de viande de porc, de bœuf et de poisson (ver solitaire).

Tænia saginata : vit dans l'intestin des humains et dans les muscles des bovins sous forme larvaire. Dans les chairs de bovins et porcins il est nommé *cystecerus*. L'absorption de ces derniers effectuée, le ver s'attache par le scolex à l'intestin et croît. Le développement sous forme de ver adulte demande 8 semaines. Des proglottides apparaissent alors dans les fèces.

Leur destruction dans les viandes (des cestodes en général) requiert :

- un chauffage minimum de 60°C pendant 15 minutes
- une congélation (- 15°C pendant 15 jours)
- une immersion dans une solution hypersalée pendant 3 semaines

Traitement : expulsion à la Trédémine (niclosamide)

Autres cestodes : *T. solium*, *Diphyllobothrium latum* (poisson), *Echinococcus granulosus* et *E. multilocularis*.

2. Némathelminthes (verts ronds)

Vers ronds intestinaux

- 1 - **Ascaris**, ascaridioses (1/4 de la population du monde) : mortalité infantile

1 femelle fécondée pond 200 000 œufs /jour dans l'intestin → selles → absorbé → foie → cœur droit → poumon → réavalé → intestin

Traitement : pipérazine

2 - Oxyure, oxyuriose → prurit anal, nervosisme

3 - Trichocéphale, trichocéphalose

4 - Trichine, trichinose : intestin, muscle, (*Trichinella spiralis*.)

La forme enkystée de la larve est consommée avec les viandes. La forme adulte se développe dans l'intestin ; la larve passe dans le sang. Cette larve passe ensuite dans le muscle strié et redonne des kystes. Le porc est souvent le vecteur de cette maladie. La maladie peut être évitée par cuisson (60°C - 15 minutes). La forme enkystée est détruite par congélation (-15°C, 20 jours).

V - 3 . Arthropodes Arachnides - Insectes - Poux - Puces - Diptères

V - 4 . Poisons de coquillages et poissons

Les symptômes apparaissent très rapidement après l'ingestion du coquillage ou du poisson (paralysies diverses).

III - 5 . Mycoses Candidoses - Aspergilloses - Teignes - Mycoses dermiques.

VI. LES VIRUS EN AGROALIMENTAIRE

VI - 1 . Généralités les virus en industrie agroalimentaire

Alors que la présence éventuelle de bactéries et moisissures est largement prise en compte par l'ensemble des filières dans la maîtrise des risques liés à la sécurité alimentaire d'un produit, celle de virus est encore de nos jours mal étudiée. Pourtant la présence de virus est aujourd'hui potentiellement détectable ; les sources primaires de contamination sont connues.

Parmi les nombreux virus responsables de pathologies humaines et transmissibles par voie alimentaire il convient d'abord de signaler :

- le virus de l'**hépatite A** (HAV, virus à ARN simple). L'aliment est impliqué dans environ 10 % des cas .
- le virus de l'**hépatite E**
- le **rotavirus** (ARN double brin avec capsid à deux couches, culture de cellules de singe FR4K4)
- l'**adénovirus** (responsable de gastroentérites virales: ADN double brin, culture de cellules de colon humain HRT 18).

La contamination des aliments est souvent d'origine fécale, la plupart des virions se retrouvant dans les fèces des personnes infectées. Dans ces conditions, les produits alimentaires les plus souvent impliqués sont l'eau, les produits de la mer, les végétaux crus (salades, etc) . Il est souvent observé que certains virus sont apportés aux aliments qui ne subissent pas de traitements thermiques (cuisson, pasteurisation, stérilisation) par des manipulateurs infectés qui ne respectent pas les règles minimales d'hygiène.

D'autres virus sont transmissibles par les aliments. Il s'agit entre autres de l'**entérovirus**, du **poliovirus**, de l'échovirus, des coxsackievirus A ou B, du virus de Norwalk, du calicivirus, de l'astrovirus, du réovirus, de l'agent de Snow Mountain, du virus épidémique non-A non-B de l'hépatite etc. (EYLES, 1986; FINANCE et SCHWARTZBROD, 1979; GERBA, 1988; POTTER , 1973 ; MAYR,1979).

La contamination d'origine alimentaire par des virus tels que ceux de l'hépatite B, de l'herpes génital ou du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) est, compte tenu de nos connaissances actuelles, fort peu probable.

Au **plan analytique**, il s'agit d'un secteur d'activité de la microbiologie de nos aliments au niveau duquel l'**immunoenzymologie** et l'**hybridation ADN(ARN)-ADN** précédée d'un **PCR** apportent des progrès considérables. Il n'en reste pas moins que les méthodes de recherche actuelles de la contamination éventuelle des aliments par des virus pathogènes pour l'homme est délicate et longue.

Il est très difficile d'attribuer à un aliment donné, compte tenu des difficultés des enquêtes épidémiologiques à mettre en place, le rôle de vecteur viral. Ainsi, seuls 10 % au plus des cas d'hépatite A recensés sont attribuables avec une bonne probabilité à une contamination d'origine alimentaire. Virtuellement, n'importe quel produit alimentaire peut servir de vecteur à des virus infectieux pour l'homme. Cependant des produits alimentaires dont l'implication à la transmission de certaines de ces maladies est fort probable ont été bien identifiés (par exemple les "coquillages comme les mollusques bivalves" ou l'eau polluée pour le virus de l'hépatite A. Dans ce cas la transmission intervient via un cycle fécal-oral dans lequel l'eau et les aliments servent de véhicules).

Certains de ces virus peuvent provoquer de maladies pour lesquelles il n'existe aujourd'hui aucun traitement. Il faut signaler ici que des virus d'origine non humaine peuvent être présents dans nos aliments; leur implication dans des maladies humaines reste cependant très peu probable, de même que celle des virus pour lesquels il n'existe pas de récepteurs spécifiques dans le tractus digestif. Il faut signaler enfin qu'il n'existe pas de vaccins pour la plupart des maladies virales transmises par nos aliments.

Les tissus au niveau desquels se produisent les infections virales sont essentiellement situés dans l'intestin grêle en amont du pylore et en aval de la jonction iléocécale. Il est actuellement acquis que la dose infectante est, pour la plupart des virus, relativement faible (100 à 1000 particules virales). Dans certains cas, il a été montré que le pharynx peut être infecté par des doses importantes de virus tels que le poliovirus.

Ces virus, qui sont des particules inertes dans les aliments, ont pour la plupart des dimensions comprises entre 25 et 100 nm, ce qui rend leur détection particulièrement difficile. Ils sont tous des parasites intracellulaires obligatoires et sont donc incapables de se multiplier en dehors de toute cellule vivante. La particule virale n'est généralement constituée que d'un acide nucléique (le plus souvent d'acide ribonucléique) et de protéines (capside et capsomères). Les protéines virales ont pour principales fonctions d'une part de protéger l'acide nucléique et d'autre part de conférer à la particule une grande spécificité de "reconnaissance" pour sa fixation sur les membranes des cellules pro ou eucaryotes. Parfois, il existe des protéines virales à activité enzymatique.

Les virus peuvent être inactivés par de nombreux traitements physiques ou chimiques. Néanmoins ce sont les traitements thermiques de type pasteurisation qui s'avèrent les plus faciles à utiliser. L'hypochlorite de sodium, les agents oxydants, les UV possèdent des propriétés viricides.

VI - 2 . Recherche des particules virales dans nos aliments

Dans les méthodes "classiques", les virus présents dans nos aliments sont généralement détectés après une liquéfaction ou une mise en suspension du produit alimentaire, suivie d'une clarification puis d'une concentration (centrifugation en présence de particules d'hydroxyde d'aluminium ou ultracentrifugation ou encore ultrafiltration sur membrane adaptée) en enfin d'une inoculation à une culture cellulaire (non utilisable pour le virus de l'hépatite A). Dans ce cas les effets des virus sont mis en évidence soit par des observations microscopiques (ECP : effets cyto-pathogènes) soit par l'observation de zones de dégénérescence dans des cultures cellulaires mono-couches. La durée totale d'une recherche de particule virale varie entre 2 et 40 jours. Les éventuelles bactéries contaminantes de la préparation peuvent être inhibées par des antibiotiques ou en présence de chloroforme ou encore par filtration sur des filtres de 0,22 µm.

Parmi les nombreux travaux publiés sur ce thème il est possible de signaler ceux de CLIVER et Coll. (1983), EWERT et PAYNTER (1980), FARRAH et Coll. (1981), FINANCE et Coll. (1981), HENDERSON et Coll. (1976), LAFRANCE et Coll. (1981), LARKIN et METCALF (1980), TIERNEY et Coll. (1980), WALLIS et Coll. (1979) etc.

Les **méthodes immuno-enzymatiques** (EIA) sont encore peu sensibles pour recherche des virus. En effet, un virion ayant une masse voisine de 10^{-17} g (acide nucléique et protéine) et la sensibilité moyenne de détection des EAI étant de l'ordre de 10^{-9} g, le nombre minimum de virus détectables se situe aux environs de 10^8 .

Il est probable que dans les années à venir, les méthodes de **détection des acides nucléiques** après amplification par le système PCR permettront une recherche rapide des particules virales dans la plupart de nos aliments (EYLES, 1990).

Les essais de recherche de particules virales par **microscopie électronique** se sont jusqu'à présents révélés négatifs.

Il faut signaler enfin qu'il n'existe malheureusement qu'une mauvaise corrélation entre le nombre de bactéries indicatrices d'une contamination fécale et la présence de virus dans nos aliments (GERBA et Coll., 1979). Par contre, WENTSEL et Coll. (1982) et SIMKOVA et CERVENKA (1981) ont mis en évidence une assez bonne corrélation entre le nombre de coliphages, faciles à détecter, et la qualité bactériologique et virologique de l'eau.

Il est donc clair qu'actuellement cette recherche de particules virales ne peut s'effectuer qu'avec des personnels hautement qualifiés et nécessite un ensemble de matériels très spécialisés.

MALADIES D'ORIGINE MICROBIENNE (*transmises par les aliments*)

MALADIES A RISQUES GRAVES - BACTERIES

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|---|--|--|---|---|---|---|
| Botulisme | <i>Clostridium botulinum</i> t° 4 à 60°C | Bacille G+, sporulé, mobile, anaérobie Neurotoxines A,B,C,D, E,F. thermolabiles (100°C,10min) Interfèrent avec l'acétylcholine Spores thermorésistantes les toxines C et D provoquent le botulisme chez l'animal DL ₅₀ = 10 ⁻⁸ mg (souris) pH 5 à 8 | Très répandu Sérothérapie | 2 h à 6 jours (24 h en moy.) <i>Nausée, vomissements, douleurs abdominales, céphalées, vertiges, lassitude, double vision constipation ; sécheresse des muqueuses, de la peau, de la bouche. Perte de réflexe à la lumière, ataxie, dysphagie, dysphonie, troubles respiratoires avec paralysie. Mortalité de 50 à 65 % en 3 à 10 jours</i> | Sol, eau, tractus intestinal des animaux | Conserves de pH > 4,5 mal stérilisées (asperges-tomates-épinards champignons - olives). Poisson fumé, salaisons non nitrées. Aliments conditionnés sous vide ou dans de l'huile |
| Fièvre typhoïde & Fièvres paratyphoïdes | <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> A,B ou C <i>Salmonella sendaii</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> | Bacilles G, asporulés, mobiles, aéroanaérobies, Oxydase - Endotoxine à activité neurotrope <i>S. typhi</i> possède l'antigène Vi (capsulaire) t° 10 à 65°C pH 6 à 7 | Endémique dans de nombreuses régions du monde Parfois épidémique traitement : chloramphénicol | 7 à 28 jours (<u>fièvre typhoïde</u>) <i>Malaise, céphalées, fièvre anoréxie, nausées, vomissements, constipation, splénomégalie, bradycardie, taches roses sur la poitrine, perspiration, délire. Durée 1 à 8 semaines</i> 1 à 15 jours (<u>fièvres paratyphoïdes</u>) <i>Septicémie, céphalées, fièvre perspiration, nausée, douleurs abdominales, vomissements, splénomégalie</i> <i>Durée de 1 à 3 sem.</i> | Porteurs "sains" Fèces et urine des hommes atteints Eau | Aliments riches en protéines (viandes, œufs, Lait, poissons, Produits de la mer) Produits consommés crus |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|---|--|--|--|---|---|---|
| Dysenterie bacillaire | <i>Shigella dysenteria</i> <i>S. sonnei</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. boydii</i> | Bacille G-, immobile (pendulaire), asporulé, aéroanérobie, Ox-, 30 sérotypes pH 6 à 7 t° 10 à 40°C | Commune Mondiale Endémique ou épidémique | 7 à 48 heures ou plus <i>Douleurs abdominales</i> <i>fièvre, diarrhée, selles</i> <i>aqueuses avec sang, mucus</i> <i>et pus, céphalée, lassitude,</i> <i>prostration, nausée,</i> <i>déshydratation</i> <i>Mortalité élevée.</i> | Fécès de malades Eau | Légumes, lait, Aliments liquides Salades, Aliments crus. |
| Choléra | <i>Vibrio cholerae</i> Biotype <i>El Tor</i> . | Vibron G-, mobile, aérobie Cultivé à pH 8,5. Le biotype <i>El Tor</i> est hémolytique. Ox + Exotoxine élaborée dans l'intestin grêle | Sporadique endémique ou épidémique Asie-Afrique | 2 à 3 jours <i>Déclenchement brutal.</i> <i>Vomissements.</i> <i>Diarrhée "riziforme"</i> <i>aqueuse avec mucus.</i> <i>Douleurs abdominales,</i> <i>déshydratation très rapide ;</i> <i>peau froide, tristesse, soif</i> <i>intense.</i> | Fécès et vomissures de malades Eau | Aliments crus Légumes, lait |
| Brucellose (fièvre de Malte) | <i>Brucella melitensis</i> (<i>B. abortus</i> <i>B. suis</i>) | Coccobacilles G-, Ox+ ou - aérobies, immobiles, capsulés | Rare Parfois endémique Pays méditerranéens | 5 à 21 jours <i>Fièvre, frissons, sueur,</i> <i>insomnie, faiblesse,</i> <i>maaises, céphalée, douleurs</i> <i>musculaires et articulaires</i> <i>amaigrissement. Convalescence</i> <i>de longue durée</i> | Animaux infectés | Lait et fromages d'ovins |
| Entérite nécrosante | <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> C | Bacille G+, sporulé, anaérobie, immobile Lécithinase - nécrotoxine | Rare Sporadique en Europe | 6 h à 6 jours <i>Diarrhée, douleurs abdominales,</i> <i>gangrène de l'intestin grêle,</i> <i>toxémie. Mortalité 40 %</i> | Fèces des animaux | Viandes cuites Poissons cuits |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|----------------------------|--|---|---|---|---|--|
| Tuberculose | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> | Bacille Alcoolo Acido Résistant (G+) Aérobie contient des lipides cireux Sa culture nécessite plusieurs semaines | Rare P.A.S. I.N.H. Streptomycine | Plusieurs semaines <i>Systèmes lymphatiques hypertrophiés</i> <i>Tubercules pulmonaire et osseuses graves</i> | Sécrétions respiratoires de l'homme Lait des animaux malades | Lait cru |
| Empoisonnement de Bongkrek | <i>Pseudomonas cocovenenans</i> | Bacille G-, Ox+ Morphologie variable Forme et couleur des colonies variables avec le milieu Produit un acide gras (a.bongkrek) qui interfère avec le métabolisme des glucides. Toxoflavine | Indonésie | Hypoglycémie <i>Spasmes graves - Mort</i> | Noix de coco ou aliments dans lesquels le développement des moisissures est incomplet | Noix de coco fermentée (incomplètement) |
| Diphthérie | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Bacilles G+, catalase+ ; Ox - ; Immobilisés. Pleomorphes Corpuscules métachromatiques Association en palissade Aéro-Anaérobie. La souche toxogène est lysogénisée. | Mondiale, rare | 2-5 jours <i>Inflammation de la sphère rhinopharyngée. Exsudats gris ; membranes. Frissons, fièvre, malaises. Œdèmes du pharynx, prostration, adénite cervicale Albuminurie, hématurie</i> | Homme Air Lait | Lait cru |
| Tularémie | <i>Francisella tularensis</i> | Bacille G-, catalase+, Ox± Aérobie strict, immobile pléomorphes. Survit très bien aux basses températures Pénètre au travers de la peau | Mondiale, rare | 8 à 24 h ou plus <i>Ulcération au niveau du site de pénétration. Frisson, fièvre élevée, prostration, stupeur, coma ganglions hypertrophiés et purulents. Peut être mortelle</i> | Sang et tissus d'animaux infectés | Lapin, lièvre (contact) |
| Anthrax intestinal | <i>Bacillus anthracis</i> | Gros bacille G+, immobile, sporulé, capsulé, souvent associés en chaînes. Catalase + Aéro-anaérobie . Ox- | Mondiale, rare | 2 à 3 jours <i>Fièvre, faiblesse, malaise, céphalée, insomnie, nausée, douleur abdominale, vomissements (avec bile et sang), diarrhée. Souvent mortel</i> | Animaux infectés, sol | Viande crue ou insuffisamment cuite - charcuteries |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|---|-----------------------------------|---|--|--|--|---|
| Infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bacille G-, mobile, Ox+ Aérobie. Pyocyanine-pyoverdine asporulé | mondiale, rare | quelques jours <i>Diarrhées, crampes abdominales nausées, vomissements, déshydratation, cyanose.</i> | Lésions cutanées Fécès humaines Eau, sol | Lait Lapin - sirops |
| Listériose | <i>Listeria monocytogenes</i> | Bacilles G+, mobiles, asporulés Microaérophiles. Catalase+, ox-, culture en milieu hypersalé 10 % Survit à la pasteurisation | mondiale, rare | <i>Fièvre, céphalée, nausée, vomissement, monocytose, méningite, lésions externes septicémie, pharyngite Avortements</i> | Tissus, urine ou lait des animaux malades | Lait - produits laitiers. Œufs Viandes Volailles |
| Pasteurellose | <i>Pasteurella multocida</i> | Coccobacille G-, catalase+, Ox- Aéroanaérobie. Immobile. Capsulé Coloration bipolaire. Pléomorphe | mondiale, rare | <i>Infections multiples Forme septicémique</i> | Animaux malades et fécès | Volailles Produits végétaux contaminés par des fécès animales. |

MALADIES A RISQUES MODERES - BACTERIES

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|---|--|--|---|---|--|---|
| Salmonelloses | <i>S. choleraesuis</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. heidelberg</i> <i>S. java</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. montivedeo</i> 1700 sérotypes (50 fréquents) | Bacilles G-, asporulés, le plus souvent mobiles, Ox-, aéroanaérobies Glu + 100 % Lac - 99 % H ₂ S+ 92 % pH 6 à 7, t° 10 à 65°C Uréase- 100 % β galac- 99 % Antigènes O et H (2 phases) | commune, mondiale charge ≥ 10 ⁶ /g | 5 à 72 h (le plus souvent 24 h) <i>Diarrhée, douleurs abdominales, frissons, fièvre, vomissements, déshydratation, prostration, anorexie, céphalée, malaise</i> <i>Durée : quelques jours. Une entérite ou une infection localisée peuvent survenir</i> <i>Mortalité 4 %</i> | Fécès, animaux domestiques Les personnes âgées, les mal-nutris, les enfants sont particulièrement sensibles | Viandes Volailles Œufs Extrait de levures Protéines (isolats) Poisson fumé Lait en poudre Coquillages |
| Intoxication staphylococcique | <i>Staphylococcus aureus</i> (entérotoxine A, B, C, D, E ou F) | Coque G+, immobile, asporulé En grappes. Aéroanaérobies Catalase+, mannitol+, culture en milieu hypersalé (10 %). Ox- Pigment jaune doré Lipase, hémolysine, coagulase Entérotoxine thermostable (16 h, 60°C) DE ₅₀ = 5 µg (singe) masse molaire = 35 000 pH 5 à 9 ; t° 10 à 45°C | commune, mondiale charge ≥ 10 ⁶ /g | 1 à 7 h (le plus souvent 3 h) <i>Déclenchement brutal. Nausées, salivation, vomissements, diarrhée, crampes abdominales, sueurs, faiblesses, prostration</i> <i>pas de fièvre</i> <i>Maladie de courte durée (1 ou 2 j)</i> | Sécrétions nasales et pharyngées Peau (mains) Furoncles, acné | Jambon, viandes Volailles Pâtisseries à la crème Aliments cuits sauces et assaisonnements Lait, fromages, Plats à base d'œufs crustacés, aliments riches en protéines |
| Toxi infection à Clostridium perfringens | <i>Clostridium perfringens</i> types A, B, C, D, E et F | Bacille G+, sporulé, anaérobie, immobile, capsulé, pH 4,5 à 7 Lecithinase +, t° 20 à 55°C 90 sérotypes charge ≥ 10 ⁸ /g Entérotoxine produite dans l'intestin par <i>C. perfringens</i> A | commune, mondiale | 8 à 24 h (le plus souvent 12 h) <i>Douleur abdominale aiguë, diarrhée. Déshydratation rare, prostration. Nausée, vomissements, fièvre et frissons sont rares. Durée 1 jour ou moins</i> | Fécès des hommes ou animaux contaminés Sol, poussières | Viandes et volailles cuites laissées à t° ambiante Aliments crus |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|--|---|--|--|--|--|---|
| Toxi infection à <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> | <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> | Vibrien G-, mobile, aérobic, Ox+, Catalase+. halophile (3 % NaCl) Antigènes O, H et K microaérophile pH 7 à 9 t° 4 à 40°C | commun au Japon Signalé de plus en en plus fréquemment ailleurs | 2 à 48 h (le plus souvent 12 h) <i>Douleur abdominale, diarrhée, selles aqueuses avec sang et et mucus.</i> <i>Nausées, vomissements, frissons, céphalée, prostration durée 2 à 5 jours</i> | Eau de mer Produits de la mer | Poissons de mer Crustacés Salaisons |
| Infection (T.I.A.) à <i>Escherichia</i> <i>coli</i> entéropathogène | <i>Escherichia coli</i> 26 : 60 B6 28 : 73 B18 55 : 59 B5 86a : 61 B7 111 : 58 B4 119 : 69 B14 124 : 72 B17 125 : 70 B15 126 : 71 B16 127 : 63 B8 128 : 67 B12 | Bacille G-, asporulé, acapsulé mobile, aéroanaérobic, Lac+, Indole+, RM+, VP-, Ox-, citrate-, uréase- possède les antigènes O, K et H sérotipe 157: H7 dans viande | De plus en plus fréquent mondiale | 5 - 48 h (en moyenne 12 h) <i>Céphalée, malaise, fièvre, frissons, diarrhée, vomissements douleurs abdominales</i> <i>Durée : quelques jours</i> <i>grave chez les jeunes</i> <i>enfants : toxique</i> | Fécès de l'homme infecté Eau | Viandes Lait et produits laitiers crus Poissons (saumon) Substituts du café |
| Infection à <i>Proteus</i> | <i>Proteus vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. morganii</i> <i>P. rettgeri</i> | Bacille G -, asporulé, acapsulé mobile, aéroanaérobic, lac-, uréase+, APP+, Ox- , KCN+ | mondiale rare | 3 à 5 h <i>Diarrhée, nausée, vomissements, crampes abdominales, collapsus des animaux</i> | Fécès de l'homme infecté et | Pâté de porc Jambon Poisson |
| Infection à <i>Providencia</i> et <i>P. sutartii</i> | <i>Providencia</i> <i>alcalifaciens</i> et <i>P. sutartii</i> uréase- , citrate+ | Bacille G-, asporulé, acapsulé, mobile, aéroanaérobic, lac-, indole+, RM+, VP-, Ox-, | mondiale rare | 2 à 24 h <i>Diarrhée, vomissements, crampes abdominales</i> | Fécès de l'homme et des animaux | Poulet |
| Infection à <i>Klebsiella</i> | <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> <i>K. rhinoschlerematis</i> | Bacille G-, asporulé, capsulé, Aéroanaérobic, lac+, citrate+, RM- , VP+, Ox- , LDC+ uréase+, immobile, APP+ | mondiale rare | 10 à 15 h <i>Céphalée, vertiges, nausée</i> <i>douleurs abdominales,</i> <i>selles aqueuses</i> | Fécès de l'homme et des animaux. | Bœuf Riz |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|---|--|---|--|---|--|--|
| Infection à <i>Citrobacter</i> | <i>Citrobacter</i> <i>Freundii</i> | Bacille G-, asporulé, acapsulé, Aéroanaérobie, lac+, citrate+, RM+ , VP- , Ox-, LDC- mobile | mondiale rare | 1 à 48 h (en moyenne 12 h) <i>Diarrhée, crampes abdominales</i> <i>nausées, vomissements, fièvre</i> <i>frissons, vertiges</i> | Fécès de l'homme et des animaux | Lait Gâteaux |
| Infection à <i>Enterobacter</i> | <i>E. aerogenes</i> <i>E. hafniae</i> <i>E. liquefaciens</i> <i>E. cloacae (Aerobacter)</i> | Bacille G-, asporulé, acapsulé, Aéroanaérobie, lac+, citrate-, indole-, RM- , VP+, Ox-, uréase- , mobile , H ₂ S- | mondiale rare | 2 à 6 h <i>Diarrhée, nausées</i> <i>vomissements</i> <i>douleurs abdominales</i> <i>Sol - plantes</i> | Fécès de l'homme et des animaux | Pâtisseries à la à la crème, lait Plats cuisinés |
| Infection à <i>Edwardsiella</i> | <i>Edwardsiella</i> <i>tarda</i> | Bacille G-, asporulé, acapsulé, Aéroanaérobie, lac-, citrate-, indole+, RM+, VP-, Ox-, uréase- , mobile | mondiale rare | <i>Crampes abdominales</i> <i>Diarrhée</i> | Fécès des (serpents- reptiles) et de l'homme | Bœuf Riz |
| Infection à <i>Aeromonas</i> | <i>A. shigelloïdes</i> <i>A. hydrophila</i> <i>A. salmonicida</i> | Bacille G-, Ox+, Catalase+ Aéroanaérobies | mondiale rare | <i>Diarrhée, douleurs</i> <i>abdominales, fièvre</i> | Eau Poissons | Poissons (maquereux) Amphibiens |
| Infection à <i>Vibrio fetus</i> ou <i>Campylobacter</i> bœuf crus <i>jejuni</i> | <i>V. fetus</i> | Vibron G-, mobile, Ox+ microaérophile (CO ₂ 10%) t° 22 à 45°C | mondiale fréquentee pH 5 -7,5 | Quelques jours <i>Fièvre, frissons, malaises,</i> <i>nausées, vomissements.</i> | Intestin des animaux, <i>myalgie, céphalée, diarrhée</i> | Lait cru Viande et foie Foie de |
| Infection à <i>Streptobacillus</i> | <i>S. moniliformis</i> | Bacilles G-, asporulés, pléomorphes en chaînes. Fragmentation en éléments bacillaires et coccobacil- laires irréguliers. Besoins nutritionnels particuliers (sang) Aéroanaérobies. | mondiale rare | 1 à 5 jours <i>Eruption cutanée</i> <i>Articulations enflées, rouges</i> <i>et douloureuses. Gorge</i> <i>douloureuse</i> | Nasopharynx des rats | Lait cru |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|---|---|--|--|--|---|--|
| Infection à <i>Arizona</i> | <i>A. hinshawii</i> 300 sérotypes | Bacille G-, asporulé, mobile Aéroanaérobie, lac-, citrate+ Indole-, RM+, VP-, Ox-, mobile ,uréase- | mondiale rare | 2 à 46 h (24 h en moyenne) <i>Douleurs abdominales, diarrhées,nausées, frissons, céphalée, faiblesse, fièvre durée : quelques jours</i> | Fécès des hommes ou des animaux (reptiles, dindons) | Dindons, pâtisseries à à la crème. Flans crèmes glacées |
| Infections à <i>Bacillus</i> | <i>B. subtilis</i> | Bacille G+, sporulé, mobile Aérobie | mondiale rare | 10 h <i>Diarrhée, crampes abdominales nausée, prostration vomissements</i> | Sol Matières orga- niques en décomposition | Poissons Dindons |
| Gastroentérite à <i>Bacillus</i> | <i>B. cereus</i> | Bacille G+, sporulé, mobile (streptobacille) Lécithinase+ Exoentérotoxine pH 7 à 8 ; t° 10 à 48°C | mondiale | 8 à 16 h <i>Nausée, crampes abdominales, diarrhée aqueuse, vomisse- ments. durée : 1 jour au moins</i> | Sol Poussières | Flans Produits céréaliers Gâteaux Sauces Viandes- pain |
| Pseudotuberculose Yersiniose | <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> | Coccobacilles G-, mobiles capsulés. Ox-, Aéroanaérobies. Catalase+ <i>Enterobacteriaceæ</i> pH 7 t° 0 à 43°C thermosensible à 50°C | mondiale | 28 h et plus <i>Fièvre, frissons, céphalée, anorexie, douleurs abdomi- nales, nausées, vomissements diarrhée. Similaire à l'appendicite</i> | Urine et fécès des animaux contaminés (poulets) sol, eau, poussière | Viandes (porc) Aliments contaminés |
| Infections à Streptocoques β hémolytiques | <i>Streptococcus pyogenes</i> | Streptocoque G+, immobile microaérophile, pyogène β hémolytique. Catalase- Groupe A et G de Lancefield 40 types antigéniques dans le groupe A | mondiale | 1 à 3 jours <i>Maux de gorge. Déglutition douloureuse Amygdalite, fièvre élevée, céphalée, nausée, vomisse- ments, malaise</i> | Hommes infectés "décharges nasales et rhyno- pharyngées" | Lait, crème glacée, œufs gâteaux |

| Maladie | Microorganisme | Caractères principaux | Fréquence | Période d'Incubation | Source | Aliments |
|---------|----------------|-----------------------|-----------|----------------------|--------|----------|
|---------|----------------|-----------------------|-----------|----------------------|--------|----------|

| (genre, espèce) | | | Répartition Traitement | Symptômes | incriminés | |
|----------------------------------|--|--|---------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Toxi infection à streptocoques D | <i>Streptococcus faecalis</i> <i>S. faecium</i> | Streptocoque G+, immobile cultive à 45°C, à pH 9,6 ou en milieu hypersalé (6,5 % NaCl) Résiste 30 min à 60°C α , β ou non hémolytique | mondiale rare | 2 à 36 h (10 h en moyenne) <i>Nausée, douleurs abdominales</i> <i>diarrhée, vomissements rares</i> | Fécès de l'homme et des animaux | Lait en poudre Viandes Gâteaux |
| <i>Actinomyces</i> | Infection à Inconnue | <i>Actinomyces</i> Viande de en fragments coccoïdes | Mycélium qui se fragmente | <i>Diarrhée, vomissements,</i> <i>Crampes abdominales,</i> <i>Prostration</i> | inconnue | 1 h chevreuil |

QUELQUES MALADIES A VIRUS ET A RICKETTSIES

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|--|---------------------------------------|--|----------------------------------|--|---|---|
| Hépatite infectieuse | Virus A | Le pouvoir infectieux est persistant après 30 mn à 56°C, après congélation et chloration (1 ppm) | mondiale | 10 à 50 jours (30 j en moyenne) <i>Lésions hépatiques. Manifestations gastrointestinales. Fièvre, malaise, lassitude, anorexie, nausée, jaunisse dérivés biliaires dans l'urine</i> | Fécès, urines Sang de l'homme infecté | Lait, eau Coquillages HJs d'orange Fraises Gâteaux à la crème Sandwichs. |
| Poliomyélite | Poliovirus | Virus nu à RNA, cubique très stable 3 sérotypes I, II, III | mondiale | 3 à 21 jours (10 j en moyenne) <i>Fièvre, céphalée, troubles gastrointestinaux, constipation, malaise. Raideur du cou et du dos. Paralysie.</i> | Fécès et Sécrétions pharyngées des personnes infectées | Lait - eau Pâtisseries à la crème Limonade |
| Fièvre Q | <i>Coxiella burnetti</i> (Rickettsie) | Bacille G-, immobile (diplo). Petite taille. Parasite intracellulaire obligatoire. Résiste 1 h à 60°C et à la déshydratation | | 2 à 3 semaines. <i>Déclenchement brutal. Frissons, céphalée, malaise Faiblesse, Sueurs, Fièvre élevée Pneumonie, toux</i> | Fécès des animaux (chat-mouton) Poussières Laine. | Lait -eau |
| Encéphalite vernoestivale russe (encéphalite à tiques) | Virus | Arbovirus de groupe B | | 7 à 14 jours. <i>Apparition brutale ; céphalée, fièvre, nausée, vomissement, photophobie, délire, coma, méningoencéphalite, paralysie (épaule). Diphasique : réapparaît 4 à 10 j après une récupération apparente. Durée 3 semaines</i> | Tiques infectées Animaux infectés | Lait cru de brebis et de chèvre (et produits dérivés) |

| Maladie | Microorganisme (genre, espèce) | Caractères principaux | Fréquence Répartition Traitement | Période d'Incubation Symptômes | Source | Aliments incriminés |
|----------------------------|---|--|--|---|---|-------------------------------|
| Grippe d'été | Virus Coxsackie du groupe A (types 2, 4, 5, 6, 8, 10 et 22) | Virus nu à RNA, cubique stable à pH bas 24 sérotypes | | 3 à 5 jours. <i>Fièvre, lassitude anorexie, maux de gorge, stomatite, vomissement, douleurs abdominales convulsions, paralysie (ENFANTS)</i> | Sécrétions rhinopharyngées | Laits pasteurisés Fromages |
| Myalgie épidémique | Virus Coxsackie du Groupe B types 1, 2, 3, 4, 5, 6 | Virus nue à RNA, cubique stable à pH bas 6 sérotypes | | 3 à 5 jours. <i>Apparition brutale fièvre intermittente, anorexie, myalgie, douleurs abdomina- les, céphalée, malaise, frissons, méningite, myocardite (ENFANTS)</i> | Fécès, sécrétions rhinopharyngées | Mal connus |
| Infections à virus ECHO | Virus ECHO (entérocytopathogène) | Petit virus, cubique, nu Stable - 33 sérotypes | | Quelques jours. <i>Diarrhée (verte, aqueuse). Fièvre</i> | | |

QUELQUES ENTEROTOXINES D'ORIGINE BACTERIENNE

“Toxines provoquant des altérations des phénomènes de transport de fluides et d'électrolytes dans l'intestin”.

150 toxines d'origine bactérienne connues (1982), 2/3 produites par des bactéries G+, 1/3 par des bactéries G- ; 70 % sont des exotoxines, 40 toxines sont actives sur les membranes.

21 sont des entérotoxines (7 produites par des bactéries G+, 14 par des bactéries G-) ; 7 entérotoxines ont pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire en AMPc cyclique (2 produites par G+, 5 par G-) et 5 entérotoxines augmentant la concentration en GMP cyclique.

5 entérotoxines produites par les bactéries G+ sont cytotoxiques et 3 par les bactéries G-.

| Microorganisme | nature | variants | masse molaire | pHi | Dose l | Mode d'action | Stabilité à la chaleur |
|--------------------------------|------------------------|---------------|---------------|-----|--------------------------------------|--|------------------------|
| BACTERIES GRAM POSITIF | | | | | | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Protéine | A,B,C,D,E,F | 35 000 | | 140 µg/kg | Interfère avec la production d'énergie et les synthèses protéique et nucléique sont inhibées. Les entérocytes sont très sensibles (détruits) | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | Protéine | | 50 000 | | 15 mg/kg (émétique) | Diarrhéogénique, dermatonécrotique ; modifie la perméabilité cellulaire. Stimule d'adénylate cyclase | - |
| | Protéine (céréolysine) | | 5 000 | | 80 µg/kg | émétique | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | A, B, C, D, E | 30 000 | | 20 µg/kg | Agit sur des récepteurs intestinaux et gastrique Incitation du pneumogastrique Hypothalamus vomissement, Hypermobilité intestinale | ++ |
| | | | | | 2 µg/kg (DE ₅₀) émétique | | |

BACTERIES GRAM NEGATIF

| | | | | | | |
|--|---------------------------|--------------|---|--------------------|---|---|
| <i>Vibrio cholerae</i> | Protéine (choléragène) | | 84 000 A1 24 000 A2 5 000 5 B 11 000 | 250 µg/kg | La région B est responsable de la spécificité de la liaison avec l'entérocyte) (monosialoganglioside) La région A active l'adénylate cyclase : ATP → AMP _C Cl ⁻ est excrété Na ⁺ non réabsorbé, H ₂ O passe dans la lumière intestinale | - |
| <i>Escherichia coli</i> | Protéine | thermolabile | 75 000 B 45 000 A 29 000 (Plasmide) | 250 µg/kg (IV) | La région A active l'adénylate cyclase. | - |
| | Protéine | thermostable | 2 000 ou 5 000 | 200 µg/kg | Stimule l'activité de la guanylate cyclase des seuls entérocytes. Effet instantané GMP _C : inhibition des transferts de Na ⁺ et Cl ⁻ | + |
| <i>Salmonella typhimurium, enteritidis</i> | Protéine | | | | Multiplication bactérienne inflammation Leucocytes ; leucocytes prostaglandines activation adénylate cyclase. | - |
| <i>Shigella dysenteriae, flexneri sonnei, boydii</i> | Protéine | | | 0,45 µg/kg (IV) | Invasion partie terminale de l'iléum et du colon : micro-ulcères. Leucocytes dans fécès | - |

PRINCIPALES RELATIONS ALIMENTS → MICROORGANISMES - CONSOMMATEURS

| Produit | Flore originelle ou endogène | | Flore de contamination | | Risques sanitaires | Type de dégradation | Microorganismes incriminés |
|-----------------------------|--|---|---|--|---|---|--|
| | Flore habituelle | Provenant d'un animal porteur sain ou malade | Indicateurs de contamination | Flore pathogène | TIAC à | | |
| Lait cru | Microcoques Streptocoques lactiques Lactobacilles | <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Mycobacterium bovis</i> * | Coliformes Clostridies Streptocoques fécaux Levures et moisissures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>E.coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> Infections à : <i>Yersinia enterocolytica</i> <i>Campylobacter</i> | Colorations et goûts divers Protéolyse Sûrissement et coagulation Protéolyse avec gaz Viscosité | <i>Pseudomonas syncynea</i> , <i>P.fluorescens</i> <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp <i>Streptococcus lactis</i> et autres bactéries lactiques <i>Clostridium</i> spp <i>Coliformes</i> , <i>Alcaligenes viscosus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> spp. |
| Laits fermentés Fromages | Microcoques Streptocoques lactiques Lactobacilles Flore lactique spontanée Flores ajoutées - lactobacilles streptocoques lactiques moisissures Levures. | <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Mycobacterium bovis</i> * | Coliformes Clostridies Streptocoques fécaux Levures et moisissures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>E.coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Shigella</i> sp. | Risques de même nature mais moins fréquents Cas particuliers de <i>Listeria monocytogenes</i> | Gonflement butyrique Goûts divers Viscosité | <i>Clostridium butyricum</i> Bactéries protéolytiques, <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i> spp |
| Crèmes et beurre | Produits à faible risque car ils subissent en général une pasteurisation ; mais il existe toujours une éventualité liée aux germes pathogènes véhiculés par le lait. | | | | | Colorations Goûts et odeurs Ranciment | <i>Pseudomonas</i> , <i>Penicillium</i> spp. <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Candida</i> spp <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>P. fluorescens</i> |

* La prophylaxie de la tuberculose bovine a réduit l'incidence de cette maladie en France et en Europe mais la tuberculose bovine existe encore dans certains autres pays.

| Produit | Flore originelle ou endogène | | Flore de contamination | | Risques sanitaires | Type de dégradation | Microorganismes incriminés |
|--|--|--|---|---|---|--|---|
| | Flore habituelle | Provenant d'un animal porteur sain ou malade | Indicateurs de contamination | Flore pathogène | | | |
| Œufs entiers en coquille | Interne : néant Externe : flore de surface (du cloaque et du sol) | <i>Mycobacterium avium</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>E.coli</i> | Coliformes Entérobactéries Streptocoques fécaux Moisissures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium</i> sp. <i>Campylobacter</i> sp. | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium</i> sp. <i>Campylobacter</i> sp. | Colorations diverses Moisissure | <i>Proteus melanovogenes</i> <i>Pseudomonas Rhodotorula spp</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Sporotrichum spp</i> |
| Ovo-produits Œufs entiers - jaunes - blancs - congelés - réfrigérés - concentrés - déshydratés - en poudre | Interne : néant Externe : flore de surface (du cloaque et du sol) | <i>Mycobacterien avium</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Campylobacter jejuni</i> - <i>E.coli</i> | Coliformes Entérobactéries Streptocoques fécaux Moisissures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium</i> sp. <i>Campylobacter</i> sp. | Diminués par pasteurisation et réfrigération ionisation Augmentés par leur manipulation | | |
| Viande en l'état (crue) | Absence ou flore paucimicrobienne | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brucella</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. <i>Lactobacillus</i> <i>Mycobacterium bovis</i> | Coliformes Streptocoques fécaux <i>Clostridium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> Lactobacilles Levures et moisissures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> entéropathogènes <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Campylobacter</i> | <i>Salmonella</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Campylobacter</i> <i>E. coli</i> entéropathogènes <i>Bacillus cereus</i> | Modification de couleur et Odeur Moisissure Putréfaction Sûrissement Viscosité | Levures, <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudomonas Rhodotorula spp</i> <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium spp</i> , mucorales, <i>Sporotrichum carnis</i> , <i>Thamnidium elegans</i> <i>Clostridium</i> protéolytiques, Coliformes, <i>Proteus spp</i> <i>Bacillus cereus</i> , bactéries lactiques, coliformes, <i>Clostridium butyriques</i> <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , Bactéries lactiques |

| Produit | Flore originelle ou endogène | | Flore de contamination | | Risques sanitaires | Type de dégradation | Microorganismes incriminés |
|---|---|---|--|--|--|--|---|
| | Flore habituelle | Provenant d'un animal porteur sain ou malade | Indicateurs de contamination | Flore pathogène | TIAC à | | |
| Viande hachée (ou attendrie) | | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brucella</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. Lactobacilles <i>Mycobacterium bovis</i> | Coliformes Streptocoques fécaux <i>Clostridium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> Lactobacilles Levures et moisissures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>E. coli</i> entéro-pathogènes <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Campylobacter</i> | Risques sanitaires accentués par les traitements de hachage | | |
| Sucre Sirops de sucre et confitures Miel | Flores de type osmophile et acidophile | <i>Bacillus</i> mésophiles <i>Clostridium</i> mésophiles | Bactéries osmophiles Levures osmophiles Moississures osmophiles | Levures Moississures <i>Clostridium</i> sp. <i>Staphylococcus</i> | Risques peu importants car milieu défavorable Attention : cas de botulisme infantile avec le miel. | | |
| Cacao et produits dérivés | Flore lactique | Détruite souvent par : - la fermentation - le séchage - la torréfaction | Moississures Bactéries sporulées | Limitée par la technologie <i>Clostridium</i> sp. | Risques faibles car stabilité des produits mais penser à <i>Salmonella</i> sp. | | |
| Hachés et crus - à consommer après cuisson (saucisse fraîche...) - à consommer après maturation (saucissons secs...). | Flore de type lactique limitée par salage et épices Flore limitée par : - maturation et dessiccation - additif : sucres nitrates, levains... | Flore éventuelle de germes mésophiles | Lactobacilles <i>Leuconostoc</i> <i>Pseudomonas</i> sp. Streptocoques fécaux Entérobactéries Microcoques <i>Bacillus</i> sp. | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Campylobacter</i> sp. <i>Yersinia enterocolitica</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Campylobacter</i> sp. <i>Yersinia</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i> | Acidification Colorations Moississure Viscosité | Bactéries lactiques <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudomonas</i> spp <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> spp <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> spp Levures |

| Produit | Flore originelle ou endogène | | Flore de contamination | | Risques sanitaires | Type de dégradation | Microorganismes incriminés |
|--|---|--|--|---|---|--|---|
| | Flore habituelle | Provenant d'un animal porteur sain ou malade | Indicateurs de contamination | Flore pathogène | TIAC à | | |
| Cuits Cuisson d'intensité variable (pâtés, jambon, boudins, rillettes...) | Flore détruite en partie par cuisson sauf bactéries sporulées | Germes sporulés pathogènes et toxigènes Entérobactéries pathogènes | Coliformes Entérobactéries Streptocoques fécaux <i>Micrococcus</i> sp. Lactobacilles sp. Levures | <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium</i> sp. | Attention surtout aux : - <i>Clostridium</i> toxigènes • <i>perfringens</i> • <i>botulinum</i> | | |
| Poisson | Chair : stérile Surface : flore psychrophile et halophile si eau de mer Intestin-branchies : - <i>Achromobacter</i> - <i>Pseudomonas</i> - Flavobactéries - Coliformes <i>E. coli</i> - <i>Clostridium</i> . | Flore pathogène propre - <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - virus, etc | Flavobactéries <i>Pseudomonas</i> Coliformes <i>Proteus Serratia</i> Streptocoques fécaux <i>Micrococcus</i> Lactobacilles | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Aeromonas</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Clostridium</i> toxigènes | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Aeromonas</i> - <i>hydrophila</i> - <i>sobria</i> <i>Clostridium</i> - <i>perfringens</i> - <i>botulinum</i> de type E. | Modifications de couleur Putréfaction | <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, Coliformes <i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. |
| Crustacés et Coquillages | Carapace : flore psychrophile Tube digestif - Flavobactéries - <i>Achromobacter</i> et germes : • aquatiques et • telluriques | Flore pathogène propre - <i>Vibrio</i> sp. - Virus, etc. | Idem | <i>Salmonella</i> Virus Flore pathogène du littoral pollué Dinoflagellés | Idem ci-dessus mais risques accrus par : - filtration de l'eau - absence de cuisson - milieu aqueux permanent | | |

| Produit | Flore originelle ou endogène | | Flore de contamination | | Risques sanitaires | Type de dégradation | Microorganismes incriminés |
|--|---|--|--|--|---|--|---|
| | Flore habituelle | Provenant d'un animal porteur sain ou malade | Indicateurs de contamination | Flore pathogène | TIAC à | | |
| Fruits et légumes | Interne : rare si intégrité de l'enveloppe Flore saprophyte abondante Flore en relation avec l'environnement | Flore phytopathogène | Germes de contamination fécale Germes telluriques Germes psychrophiles | Entérobactéries pathogènes <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i> | <i>Salmonella</i> sp. <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i> | Anthracnose Moisissure Pourriture molle Fermentation acide et viscosité Moisissure | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> spp <i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizopus nigricans</i> <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> spp <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i> spp <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Peronospora</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> spp, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Xanthomonas</i> spp <i>Rhizopus</i> spp, <i>Sclerotinia sclerotinium</i> |
| <i>Penicillium</i> , | | | | | | Pourriture molle bactérienne Pourriture molle fongique | |
| Jus de fruits ou de légumes frais ou traités (sucre + gaz + sel) | Flore de type : - lactique - acidophile Flore stabilisée par: - pasteurisation - filtration ou conservateur Flore osmophile (levures- <i>Leuconostoc</i>). | Flore phytopathogène | Coliformes Microcoques Streptocoques fécaux Bactéries sporulées telluriques | Entérobactéries pathogènes <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> | Risques peu importants car conditions défavorables : acidité du produit Risques liés : - à la nature des | Mauvais goût et fermentation alcoolique Piqûre acétique Piqûre lactique Trouble et dépôt Viscosité | Byssoschlamys, <i>Rhizopus</i> spp, levures Acetobacter, <i>Gluconobacter</i> spp Bactéries lactiques diverses Levures <i>Leuconostoc</i> spp |

| <i>Produit</i> | <i>Flore originelle ou endogène</i> | | <i>Flore de contamination</i> | | <i>Risques sanitaires</i> | <i>Type de dégradation</i> | <i>Microorganismes incriminés</i> |
|----------------------|---|---|--|--|--|---|--|
| | <i>Flore habituelle</i> | <i>Provenant d'un animal porteur sain ou malade</i> | <i>Indicateurs de contamination</i> | <i>Flore pathogène</i> | <i>TIAC à</i> | | |
| Céréales | Flore saprophyte de surface | Flore phytopathogènes | Coliformes Bactéries sporulées Levures Moisissures | Faible ou nulle Bactéries mésophiles et sporulées pathogènes Moisissures | Liés à l'apport de bactéries pendant les manipulations Problème particulier de bacillus cereus dans le riz chauffé Attention aux moisissures toxogènes (<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>) | | |
| Farines | Flore réduite après opération du blutage et du blanchiment | Flore phytopathogène réduite | Idem | Idem | Idem (mais plus rares) | Fermentation Moisissure | <i>Bacillus spp</i> , levures <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium spp</i> , mucorales |
| Conserves à pH < 4,5 | Flore de la matière première en partie et <i>saccharolyticum</i> | Insuffisance de traitement thermique détruite par | Flore de l'environnement par ou non-conformité | Entérobactéries pathogènes | Attention : <i>Bacillaceae</i> <i>Clostridium</i> sp. pénétration | Fermentation de type butyrique avec bombement <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus</i> gazogènes, <i>Clostridium</i> <i>C. perfringens</i> , <i>C. thermo-</i> <i>Clostridium botulinum</i> |
| Conserves à pH > 4,5 | traitement thermique (flore mésophile) donc germes sporulés thermo-résistants | des conditions physicochimiques Germes mésophiles éventuellement (par très grave insuffisance de traitement thermique) | accidentelle Streptocoques sp. Coliformes <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Clostridium</i> sp. | | "Flat sour" Noircissement Putréfaction | <i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. stearo-thermophilus</i> <i>Clostridium nigrificans</i> <i>Clostridium putrefaciens</i> , <i>Cl. sporogenes</i> |

| <i>Produit</i> | <i>Flore originelle ou endogène</i> | | <i>Flore de contamination</i> | <i>Risques sanitaires</i> | <i>Type de dégradation</i> | <i>Microorganismes incriminés</i> |
|----------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---------------------------|--|---|
| | <i>Flore habituelle</i> | <i>Provenant d'un animal porteur sain ou malade</i> | <i>Indicateurs de contamination</i> | <i>Flore pathogène</i> | <i>TIAC à</i> | |
| Vin | | | | | Goûts divers Piqûre acétique Piqûre lactique "Tourne" Trouble et dépôt Viscosité Voile <i>membranafaciens</i> | <i>Lactobacillus, Pediococcus spp</i> <i>Acetobacter aceti, Glutobacter oxydans</i> <i>Lactobacillus fermenti, L.buchneri</i> <i>Lactobacillus spp</i> Levures <i>Aureobasidium pullulans, Leuconostoc spp</i> <i>Candida mycoderma, Pichia</i> |
| Bière | | | | | Dépôts Goûts divers Piqûre acétique Piqûre lactique Viscosité | Levures Coliformes, levures "sauvages", <i>Pediococcus cerevisiae, Zymomonas spp</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Lactobacillus spp</i> <i>Lactobacillus brevis</i> |

VII. PREVENTION DES RISQUES MICROBIOLOGIQUES PAR LA MAITRISE DES POINTS CRITIQUES

Méthode **HACCP : hazard analysis critical control point**

Il s'agit d'une méthode structurée qui permet d'intervenir à la fois sur le plan préventif et sur le plan correctif.

Des documents (transparents disponibles directement ou sous forme de documents informatiques sous Power Point) sont mis à disposition et permettent in situ d'aborder les thèmes Qualité - HACCP - Certification, thèmes souvent proposés au cours de stages ou emplois.

Les quelques définitions données ci-dessous permettent d'aborder simplement ce thème.

Un **point critique** est le point d'un procédé où un défaut de prévention de la contamination peut être détecté par des examens de laboratoire avec une efficacité suffisante (FDA 1972). Pour l'ICMSF (1986), il s'agit d'un point ou procédé pour lequel l'absence de maîtrise peut conduire à un risque sanitaire inacceptable.

Un **danger** est une éventualité inacceptable pour le fabricant, le produit, l'utilisateur ou le consommateur. Il peut être de nature microbiologique, chimique, physique, administrative, réglementaire etc.

La probabilité d'apparition d'un danger est désignée sous le vocable de **risque**.

On évalue les causes d'un danger en calculant par exemple un **indice de risque (IR)**

La démarche HACCP s'insère généralement dans une démarche contrôle qualité - certification

Contrôle de la qualité: vérification de la conformité à des données préétablies, suivie d'un jugement.

Assurance de la qualité: mise en oeuvre d'un ensemble approprié de dispositions préétablies et systématiques destinées à satisfaire à l'obtention de la qualité requise.

La norme ISO 9000 (Food Technology, nov 1992, 74-80)

Disponible après de librairies spécialisées ou de l'AFNOR

Ses chapitres passent en revue tout ce que l'entreprise doit mettre en oeuvre pour donner pleine confiance à ses clients et pas seulement pour ses produits.

Il s'agit d'un standard international qui définit un certain nombre de règles de bon fonctionnement des divers processus de l'entreprise. Elle est décernée par des organismes agréés dans chaque pays; en France ce sont l'AFAQ (Association Française pour l'Assurance de la Qualité) et la COFRAC qui sont chargées de cette mission. Il s'agit d'un organisme totalement indépendant. En Europe, il n'y a pas encore de reconnaissance réciproque automatique d'un pays à un autre.

Une entreprise peut se faire certifier à différents stades de son activité et il existe trois niveaux de certification pour la norme ISO 9000 :

- la norme **ISO 9001** touche toute la chaîne de production depuis la conception jusqu'à l'arrivée du produit fini chez le client et son service après-vente

- la norme **ISO 9002** assure la qualité d'un processus plus court: de la production à l'installation / arrivée chez le client
- la norme **ISO 9003** ne s'attache qu'à la qualité des produits finis et non à la production

Pour les deux premiers niveaux les aspects marketing et commerciaux sont concernés .

Une certification ne doit cependant pas constituer une fin en soi et ce n'est pas un "diplôme" obtenu définitivement et indéfiniment. En fait c'est un engagement de l'entreprise à entrer dans la dynamique du progrès qualité en adoptant une démarche vers la maîtrise totale de la qualité.

Il existe d'autres normes ISO. La norme **ISO 14000** se préoccupe de l'environnement de « l'industrie ».

1. Contrôle traditionnel, limites, inspection, analyse microbiologique

La démarche traditionnelle correspond à l'ensemble des opérations :

- d'éducation et de formation
- d'inspection
- d'analyse microbiologique

L'**inspection** correspond surtout à une vérification du respect de règles (Codex Alimentarius, textes réglementaires, décrets, lois, circulaires etc.). Elle manque de spécificité et de discernement entre l'essentiel et le secondaire, **surestime des exigences relatives à des points mineurs et augmente souvent les coûts de production sans réduction effective des risques.**

L'**analyse microbiologique** est réalisée sur les produits à tous les stades et le matériel. Ses avantages sont de représenter des valeurs de référence, d'aider à l'appréciation de l'hygiène et de constituer un argument souvent indispensable pour les échanges commerciaux.

Ses limites sont inhérentes aux difficultés d'échantillonnage, à la significativité des examens (faible corrélation entre index, germes pathogènes et germes indicateurs), au faux sentiment de sécurité qu'elle génère, à la restriction qu'elle peut apporter quant au développement de produits ou procédés nouveaux.

2. Le système HACCP

2 - 1. Historique. Notion de qualité microbiologique

C'est dans les années 1970 que le concept HACCP commence à voir le jour. Par exemple en 1974 KAUFMANN et SCHAFFNER ont présenté ce concept dans une communication intitulée: " HACCP and good manufacturing practices regulations in food plant inspection. " Les premières Sociétés à adopter ce concept sont la NASA, Campbell Soup Co et Pillsbury Company. Dès 1975, la FDA (Food Drug Administration) met en place des formations et en 1976 la FAO édite un rapport dans ce sens (n° 598). En 1977 un ouvrage est publié sur ce thème (DOYLE et MITTLER, Control of critical points in food processing - A system approach. Vol 1. The Bosley Corporation Ed).

Le concept ne cesse de prendre de l'importance dans les années 1980 et le nombre de publications sur ce thème devient alors très important.

En France c'est **J.J. JOUVE** de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes qui en a été le promoteur dans les années 80.

La plupart des industries agroalimentaires ont adopté à ce jour (ou se doivent d'adopter) ce système intégré dynamique qui apporte des avantages considérables au niveau de l'assurance qualité.

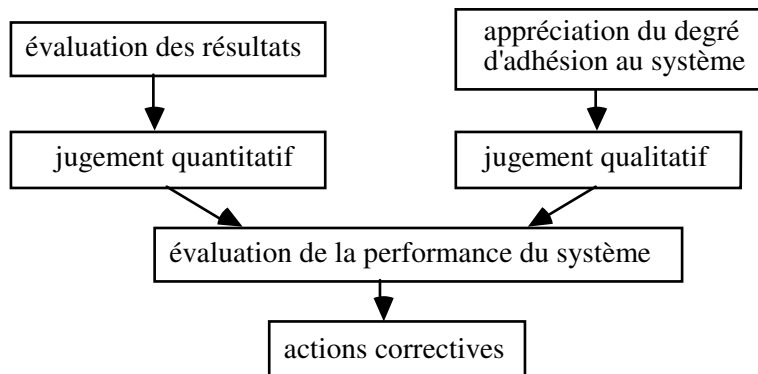
2 - 2 . Le système HACCP en tant que démarche structuraliste et intégrée

Ce système est caractérisé par sa **primauté**. Il s'agit d'un enchaînement d'actions dans un ensemble cohérent et coordonné :

- objectifs du système bien définis
- appréciation de son environnement et de ses ressources
- conception, organisation, mise en oeuvre des composants du système (activité, missions, mesures)
- évaluation de la performance des composants nécessaire à l'évaluation de la performance du système
- actions correctives

Ce système implique une **méthode de travail associant** :

- un idéal d'intelligibilité identification puis évaluation des risques; identification des points critiques)
- une démarche formalisée par le choix des options de maîtrise et de surveillance, par la réalisation du contrôle.
- une intention critique



Le HACCP est un modèle de l'**assurance qualité**, assurance qui est selon l'AFNOR, l'ensemble des dispositions préétablies et systématiques destinées à donner confiance.

3 . Principales étapes

3 - 1 . Etablissement d'un diagramme de fabrication détaillé

Enumération de toutes les étapes de la fabrication; chaque étape est elle-même dissociée selon les multiples opérations auxquelles elle donne lieu .

Compréhension et analyse de chacune des étapes ou opérations.

3 - 2 . Identification et évaluation des risques

Notion de **risque**: la probabilité d'apparition d'un danger est la conséquence de contamination et/ou développement de microorganismes pathogènes et/ou responsables d'altérations à un niveau inacceptable, le danger restant potentiel pendant la vie commerciale et/ou d'utilisation du produit.

Cette notion s'applique au niveau des matières premières et des produits susceptibles de renfermer de microorganismes ou de permettre leur survie ou leur développement depuis la production jusqu'à la distribution et la présentation domestique.

Il s'agit d'abord de déterminer, au niveau des matières premières et/ou des produits, la probabilité de présence de microorganismes et/ou de leur développement. Deux opérations sont à réaliser dans ce sens :

1) Une démarche formelle et de laboratoire qui requiert des informations :

- commerciales (germes responsables d'altérations, enquêtes sur les produits déjà commercialisés, stabilité, analyses de laboratoire)

- épidémiologiques pour les germes pathogènes (programme de surveillance, informations sur les maladies transmissibles, les TIA). Informations sur les microorganismes concernés, les denrées à risques, la sensibilité des consommateurs.

- écologique : flores présentes au niveau des matières premières aux plans qualitatif et quantitatif ; germes introduits au cours de la production, transformation, distribution, utilisation ; biologie de ces germes et relations substrat - microorganisme.

- techniques sur la structure, composition des matières premières et des produits (nature, formule, pH, activité de l'eau, conservateurs, conditionnement etc.)

- techniques sur les traitements, la distribution, la préparation, la survie, le développement ou la mort des microorganismes (facteurs intrinsèques et extrinsèques implicites au développement microbien dans un produit donné dans des conditions données).

2) La caractérisation des ingrédients, des produits et des "conditions de fabrication"

- des ingrédients sont susceptibles d'être des vecteurs de risques
- la fabrication n'inclut pas d'étapes capables de détruire les microorganismes
- il existe des possibilités d'erreurs dans la fabrication ou la distribution pouvant entraîner l'altération ou rendre le produit dangereux.

Evaluation de l'indice de risque IR

Cet indice IR prend en compte 3 critères liés à la cause des dangers :

1er critère : la **gravité G** de la cause des dangers

(G varie entre 1 : gravité mineure à 8 : gravité catastrophique en passant par les valeurs entières comprises entre 1 et 8)

2ème critère : la probabilité de **détection D** de la cause de dangers

(D varie entre 1 et 4 ; D = 1 signifie que la probabilité de détection est très élevée; une valeur de 4 signifie que la détection est très délicate). Si la probabilité de détection est très élevée, le risque est faible donc D = 1. Inversement si la probabilité de détection est très faible le risque devient très élevé donc D = 4.

Un exemple de D = 4 : intérêt financier direct entre un labo de contrôle qualité et un fournisseur

3ème critère : la **fréquence F** d'apparition de la cause de dangers.

Elevée si le risque se répète souvent. Les valeurs de F adoptées sont généralement comprises entre 1 et 3 (1 : faible et 3 : élevée)

L'indice de risque est obtenu en multipliant les valeurs des trois critères G, D et F.

$$\text{IR} = \text{G} \cdot \text{D} \cdot \text{F}$$

Plus le risque est élevé et plus les valeurs attribuées aux trois critères G, D et F sont élevées. et donc plus IR est élevé ($1 < \text{IR} < 96$).

IR permet d'évaluer chaque cause de danger.

En comparant les IR obtenus pour plusieurs causes de danger, il est possible de hiérarchiser les causes de danger les unes par rapport aux autres.

(Il est bien sûr possible de codifier personnellement les valeurs de IR dans un système donné).

3 - 3 . Identification des points critiques et de contrôle

Un **point critique (CCP)** correspond à un point, une étape ou encore une procédure qui peut et qui doit être maîtrisé afin d'éliminer les dangers ou réduire leur probabilité d'apparition à un niveau acceptable.

Un point critique correspond à une étape clé de la chaîne logistique ou de fabrication au niveau de laquelle les moyens mis en œuvre doivent être concentrés et intensifiés pour garantir l'amélioration de la qualité ou tout au moins son maintien.

Toutes les causes de danger ne sont pas des points critiques.

Les points critiques sont généralement identifiés grâce à la réalisation d'un **organigramme appelé arbre décisionnel du Codex alimentarius**.

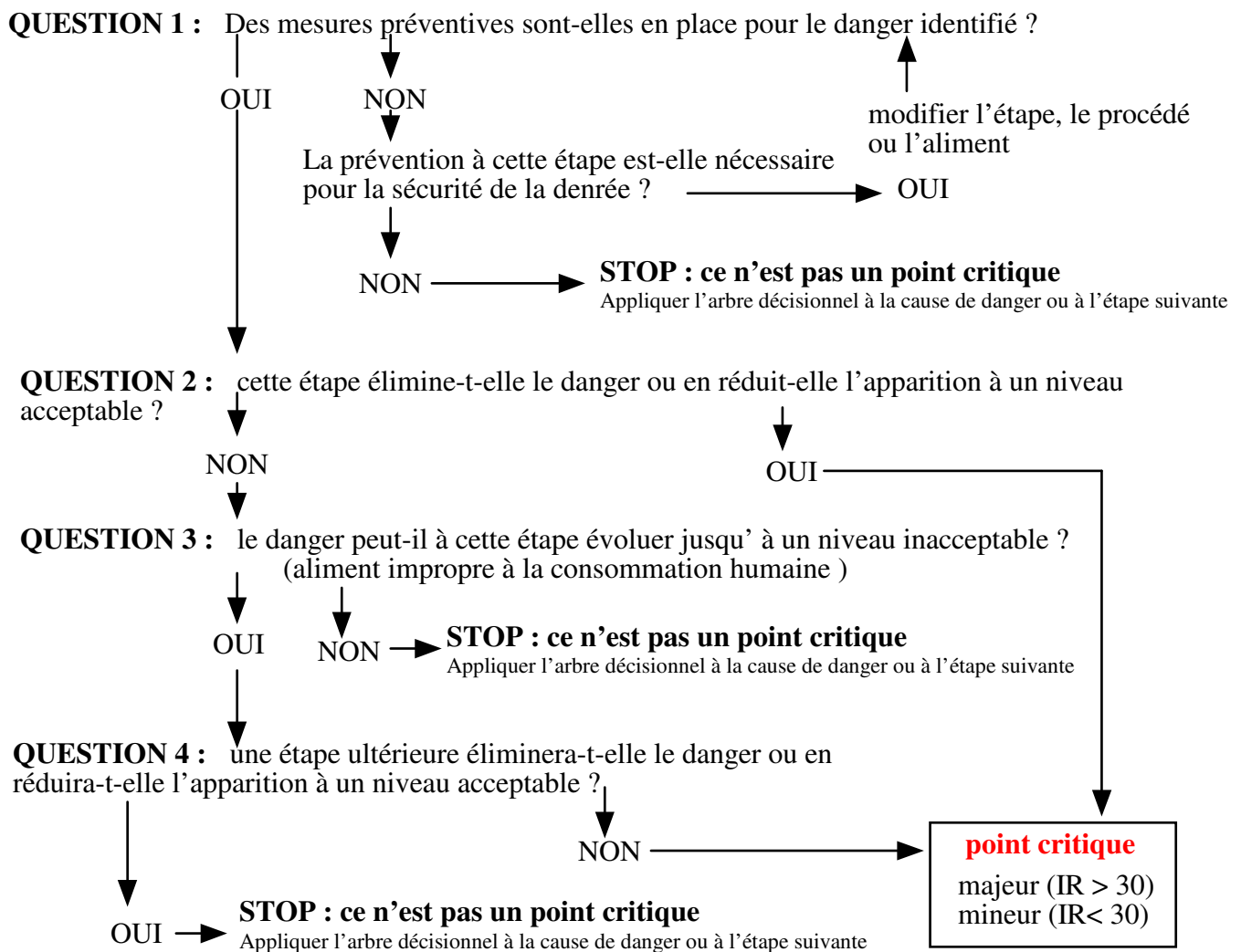
Leur identification est évidente par analyse d'un diagramme de fabrication et des risques: points de contamination, point de survie, zone de multiplication etc.

Si une cause de danger n'est pas un point critique cela signifie que :

- la prévention de cette étape n'est pas nécessaire pour la sécurité de la denrée alimentaire, des utilisateurs, des bénéficiaires etc.
- et/ou le danger ne peut pas apparaître à cette étape ni évoluer jusqu'à un niveau inacceptable
- et/ou une étape ultérieure éliminera le danger ou en réduira l'occurrence à un niveau acceptable.

Arbre décisionnel du Codex alimentarius

Pour chaque danger identifié on répond aux 4 questions suivantes :



3 - 4 . Choix des options de maîtrise aux points critiques

Chaque système requiert des choix adaptés et propres. Il faut s'assurer de la validité et de l'efficacité des choix. Il s'agit souvent de mesures préventives. Si le danger ne peut être complètement éliminé, les mesures préventives visent alors à réduire sa probabilité d'apparition à un niveau acceptable; ce niveau correspond obligatoirement à une denrée de qualité acceptable.

3 - 5 . Choix des opérations de surveillance

S'assurer de leur utilité, fiabilité, justesse et précision. La surveillance correspond aux moyens d'obtenir l'assurance et de vérifier que les opérations de contrôle et d'élimination éventuelle des points critiques sont correctement réalisées. Des documents (enregistrements, contrôles) sont exigés et attestent de leur réalisation. Ils permettent de localiser les éventuelles pertes de maîtrise des points critiques.

Le système de surveillance a pour but :

- d'assurer la maîtrise effective des points critiques, donc de prouver le bon fonctionnement du système
- de localiser l'apparition d'un danger ou d'une dérive par rapport aux normes.

3 - 6 . Réalisation du contrôle

Mise en oeuvre de procédures de maîtrise et de surveillance. La primauté du système est généralement admise pour l'assurance qualité.

3 - 7 . Actions correctives (prévision)

Il s'agit de démarches à suivre en cas de perte de maîtrise d'un point critique.

4. L'auto-contrôle

Il s'agit du contrôle exercé par le fabricant soit dans son propre laboratoire, soit par un laboratoire extérieur. Il est rendu obligatoire par la réglementation.

Jusqu'en 1975- 1980, l'autocontrôle était effectué sur des produits finis (arrêté du 31 déc 1979). Les normes de cet arrêté ne s'appliquent pas aux produits finis sortant d'usine mais à des produits avant consommation. Le fabricant doit alors proposer des aliments qui au terme de leur DLC (durée limite de commercialisation) répondent aux normes de l'arrêté sans pour autant avoir la maîtrise d'un certain nombre de paramètres comme par exemple la température de stockage. Le fabricant est donc amené à établir des normes propres internes qui permettent l'extrapolation: par exemple il propose en sortie d'usine un jambon cru emballé avec 1000 germes mésophiles par gramme pour répondre aux exigences normatives après 5 semaines d'entreposage (DLC) qui sont de 3.10^5 par gramme.

Les critères à satisfaire par produit sont très nombreux (FAMT, coliformes totaux et thermotolérants, staphylocoques, salmonelles, anaérobies sulfito-réducteurs etc.) ce qui rend l'autocontrôle non réalisable en routine. Par ailleurs en fabrication , il faut prendre en compte les germes d'intérêt technologique, ce qui alourdit l'analyse. Très souvent, le suivi de la qualité en autocontrôle est limité à la FAMT et aux coliformes. De plus cet autocontrôle ne s'exerce qu'à posteriori sur un produit fini sur lequel on ne peut plus agir sinon le retirer de la commercialisation.

Les contrôles sont donc reportés de plus en plus en amont dans la fabrication jusqu'aux matières premières et les points critiques de contamination et multiplication microbienne sont identifiés et maîtrisés (HACCP).

III - LES AGENTS ANTIMICROBIENS

L'utilisation d'agents antimicrobiens permet de contrôler le développement des microorganismes, et plus particulièrement des microorganismes pathogènes et (ou) des microorganismes responsables des phénomènes de dégradation des produits alimentaires.

Les moyens de lutte contre les microorganismes sont très nombreux et peuvent être schématiquement classés en :

- agents physiques (température, rayonnements, etc)
- agents chimiques (leur activité et leur nocivité s'appliquent aussi bien aux cellules microbiennes qu'aux cellules humaines ou animales)
- d'autres agents au pouvoir de toxicité sélective; ils s'opposent par exemple à la multiplication microbienne sans nuire aux cellules de l'hôte. Cette propriété permet leur utilisation en thérapeutique.

I - GENERALITES/TERMINOLOGIE

I - 1. Stérilisation

Il est bon de rappeler que la stérilisation est communément considérée comme la destruction de tous les microorganismes d'un milieu et ce, quelles que soient leurs structures ou leurs propriétés. Aucun microorganisme n'est alors revivifiable dans ces conditions et le matériel ou l'aliment traité est qualifié de stérile.

I - 2. Désinfectants

Il s'agit d'agents chimiques capables de détruire les germes pathogènes dans des milieux extérieurs à l'homme (eau, sol, air, etc). Le terme désinfectant est généralement réservé aux substances agissant sur des objets inanimés. Dans ces conditions, il est possible d'utiliser de telles substances à concentrations élevées, avec des temps de contact prolongés. Les produits sont parfois qualifiés de **germicides**.

Selon l'AFNOR, "*la désinfection est une opération , au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables supportés par des milieux contaminés*".

I - 3. Antiseptiques

Un produit est qualifié de **septique** s'il contient des microorganismes. L'aseptie est la propriété correspondante à l'absence de germe.

Les **antiseptiques** sont des agents chimiques capables de détruire les microorganismes ou d'arrêter leur développement (microbicides ou microbiostatiques). Ils exercent généralement une action locale chez les êtres vivants.

Selon l'AFNOR, "*l'antiseptie est une opération , au résultat momentané , permettant de tuer ou d'éliminer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus au niveau des tissus vivants dans la limite de leur tolérance*".

Désinfectants et antiseptiques, toxiques, ne sont généralement pas administrés à l'homme par voie générale ou ingérés (il existe des exceptions comme celle de l'ingestion d'hypochlorite de sodium utilisé pour rendre l'eau potable).

I - 4 . Conservateurs alimentaires

A l'exception de certains antibiotiques, il s'agit généralement de substances chimiques additionnées aux aliments dans lesquels elles diminuent ou empêchent la multiplication de microorganismes responsables d'altérations.

I - 5. Sulfamides et antibiotiques

Il s'agit de substances chimiques actives sur les bactéries mais aux doses employées peu ou pas toxiques pour les autres cellules humaines ou animales. Parmi ces agents chimio-thérapeutiques on peut signaler :

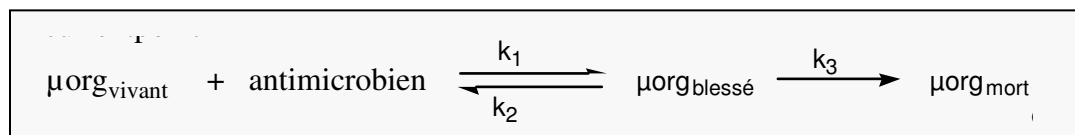
- les sulfamides qui sont des produits chimiques de synthèse
- les antibiotiques qui sont des produits chimiques élaborés par certains microorganismes vivants (au moins pour la molécule de base) et dotés d'une grande spécificité d'action.

Ces substances agissent à des concentrations très faibles (de l'ordre du µg/ml). Elles peuvent avoir des effets bactériostatiques (ou fongistatiques), inhibant la multiplication ou des effets bactéricides (ou fongicides ou virucides) létaux pour les microorganismes.

II. LOIS DE DESTRUCTION DES MICROORGANISMES

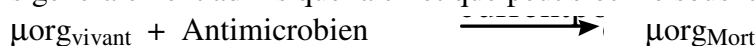
II - 1. Généralités

Lorsqu'une suspension homogène d'une souche pure (d'un microorganisme dont on veut étudier la cinétique de destruction) est soumise à un traitement antimicrobien, il se produit une destruction non instantanée. Ce phénomène répond à des lois cinétiques, l'équation de base du phénomène étant la suivante :



La vitesse globale de la réaction est exprimée par : $v = k_3 \cdot [\mu\text{org}_{\text{blessé}}]$

Il est alors généralement admis que la cinétique peut s'écrire sous la forme :



La formulation mathématique en est la suivante :

$$\frac{d[\mu\text{org}_v]}{dt} = -k \cdot [\mu\text{org}]^a \cdot [\text{Antimicrobien}]^b$$

L'ordre par rapport au microorganisme a est souvent estimé à 1, tandis que celui des antimicrobiens est compris entre 0,5 et 1.

La résolution de cette équation, dans la mesure où la concentration en antimicrobien ne varie pas (en excès) est alors la suivante :

$$\text{Log } [\mu\text{org}_v] = -k_{\text{obs}} \cdot t + \text{log } [\mu\text{org}_v]_0$$

avec

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{antimicrobien}]^b$$

Dans la cinétique chimique, ce sont les variations de concentration qui sont considérées. Or dans l'équation de destruction, il y a hétérogénéité d'unité (nombre de microorganismes et concentration).

Dans la cellule microbienne, il existe une grande variété de molécules (2 000 protéines par exemple) qui peuvent être les cibles privilégiées des agents antimicrobiens utilisés. Ainsi, si l'effet sur des molécules microbiennes est irréversible (ADN, protéines) la cellule évolue vers la mort en fonction du niveau de molécules "inactivées". C'est à partir du moment où il ne restera plus assez d'une molécule nécessaire à l'expression de la vie (multiplication, respiration, fermentation) que le germe mourra (bactéricides). Par contre si l'effet est réversible ou si le niveau de destruction n'affecte pas toutes les molécules, laissant alors le germe "inactif mais non mort", on parle de bactériostase.

Si une seule cellule est considérée et une seule espèce moléculaire dans cette cellule on peut écrire l'effet d'un antimicrobien en excès par :

$$\frac{d[\text{composé}]}{dt} = -k_{\text{obs}}[\text{composé}]^a$$

Pour n cellules on peut alors écrire :

$$\frac{d[n.\text{composé}]}{dt} = -k_{\text{obs}}[n.\text{composé}]^a$$

Si la concentration en composé est considérée comme constante dans le corps microbien on a:

$$\frac{d(N)}{dt} = -k_{\text{obs}} N^a \quad \text{soit} \quad \text{Log}_{10} N = -k'_{\text{obs}} \cdot t + \text{Log}_{10} N_0$$

avec n nombre de cellules au temps t
 N_0 nombre initial de cellules - **charge initiale** -
 k'_{obs} constante de vitesse "apparente" en temps⁻¹

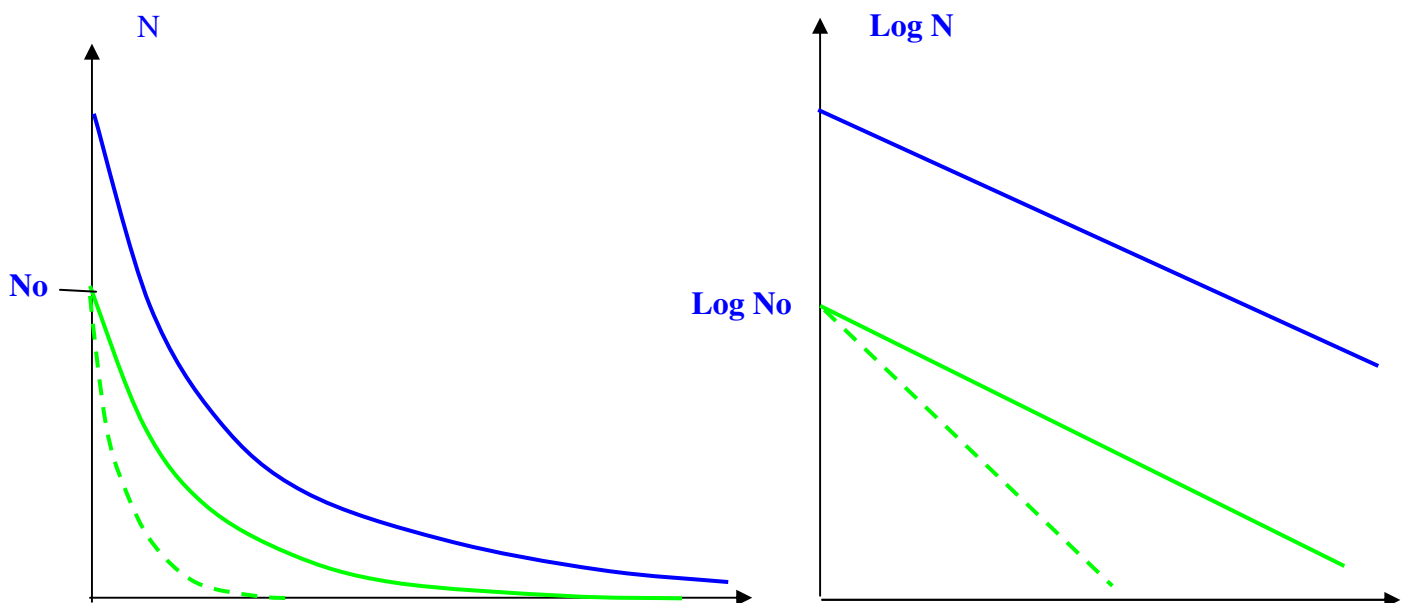


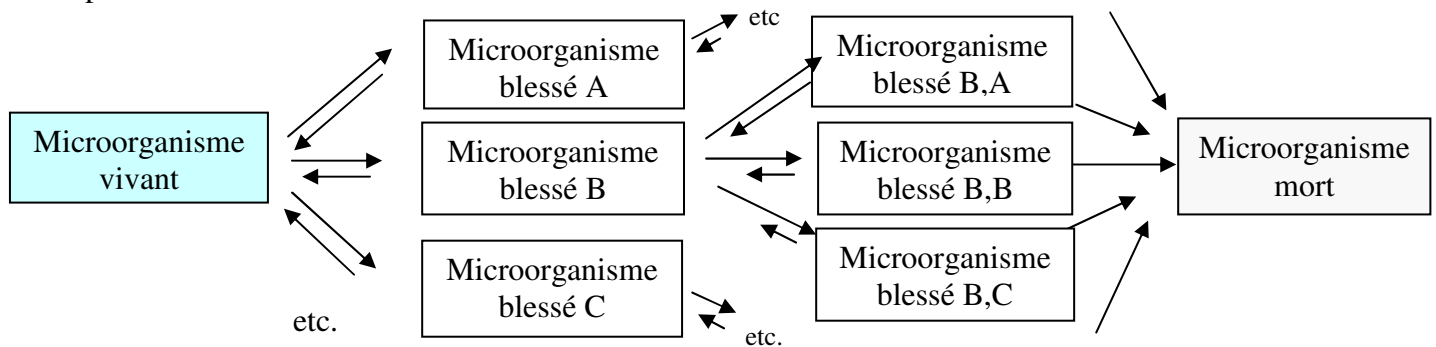
Figure 1.

Destruction des microorganismes en fonction du temps à 3 niveaux de concentration en antimicrobien [1] > [2] > [3], à 2 niveaux de "charge" initiale pour la concentration 3 (3').

II-2. La cellule microbienne et l'antimicrobien. La mort microbienne

Quelque soit l'agent antimicrobien utilisé, ses effets sur les microorganismes ne sont pas "instantanés" et le passage d'un microorganisme vivant à un microorganisme mort suit en fait de nombreuses voies, seuls l'état initial et l'état final étant bien définis.

Le suivi de la réaction requiert des méthodes d'évaluation de ces divers états microbiens. La plupart des méthodes traditionnelles (culture) permettent l'évaluation des microorganismes vivants et des microorganismes légèrement blessés. Les microorganismes "gravement" blessés peuvent être déterminés après revivification tandis que les microorganismes "très gravement" blessés sont incapables de se multiplier même dans des conditions de culture "idéales"



La mort d'un microorganisme se traduit par une perte irréversible de son pouvoir de reproduction ou de croissance. Pour un antimicrobien donné, il est souvent possible de définir une « réaction sensible critique » qui conduit au niveau cellulaire à l'effet observé. Dans ce cas, la cinétique au niveau d'une population peut être modélisée à partir des « cinétiques classiques » d'inactivation de ces constituants.

Pour évaluer la mort microbienne, le **dosage de l'ATP** est une des méthodes les plus utilisées. En effet, ce métabolite "énergétique" a une concentration sensiblement constante dans une cellule vivante, cette concentration chutant très rapidement à 0 après la mort. L'évaluation de la fluorescence des acides nucléiques après coloration à l'acridine orange (ADN : verte ; ARN : rouge) permet aussi une évaluation de l'activité cellulaire. Une cellule morte ou inactive possède un rapport ARN/ADN petit tandis qu'une cellule en activité métabolique possède un rapport ARN/ADN élevé.

III. FACTEURS INFLUENCANT L'ACTION ANTIMICROBIENNE

III-1. Le microorganisme

- Toutes les **espèces** ne sont pas également sensibles à un agent antimicrobien ; ce dernier est d'ailleurs caractérisé par son spectre d'activité. Néanmoins, si l'agent antimicrobien est actif sur de très nombreuses espèces moléculaires, son efficacité sera universelle.

- L'**état physiologique** de la bactérie influe sur sa sensibilité : ainsi les bactéries sont moins résistantes en phase exponentielle de croissance à l'action des agents antimicrobiens chimiques qui sont très rapidement absorbés par le germe alors que les cellules âgées de 24 h ou plus sont souvent plus sensibles à des traitements physiques.

Les formes **sporulées** sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques ou chimiques que les formes végétatives correspondantes.

- Plus le **nombre initial** de microorganismes est élevé (*charge*), plus le temps exigé pour obtenir un niveau destruction donné sera grand, toutes conditions étant égales par ailleurs.

III - 2 . Le temps de traitement

L'action antimicrobienne suit une loi cinétique .

III - 3 . L'agent antimicrobien

De nombreux paramètres contrôlent l'action antimicrobienne. Ainsi l'action létale des agents physiques augmente généralement avec leur **intensité** d'application ; les agents chimiques pourront, selon leur **concentration**, posséder des effets bactériostatiques ou bactéricides. La stabilité de certains agents antimicrobiens chimiques est nécessaire à l'expression de leur activité antibiotique tandis que pour d'autres comme l'hypochlorite de sodium, le peroxyde d'hydrogène l'activité n'est nette que lors de leur décomposition.

Pour les agents chimiques, la solubilité dans l'eau est un facteur déterminant de leur activité.

III - 4. L'environnement

L'environnement peut influencer considérablement l'efficacité des agents antimicrobiens physiques ou chimiques. Parmi les principaux facteurs influençant, on peut signaler :

- le pH du milieu
- la turbidité, la viscosité (les U.V. ne sont actifs que sur quelques millimètres de profondeur en milieu limpide)
- la dureté de l'eau (les ions calcium et magnésium diminuent par exemple l'activité antimicrobienne d'un désinfectant comme les ammonium quaternaires)
- les matières organiques (les protéines précipitent en présence d'alcool et le précipité formé empêche la diffusion de l'alcool ; les hypochlorites donnent, en présence de matières organiques des chloramines moins actives, etc...)
- la température peut modifier l'action de certains agents antimicrobiens chimiques (la plupart des antibiotiques perdent leur activité à température élevée).

IV. AGENTS PHYSIQUES

En raison de leur faible spécificité d'action, la plupart des agents physiques antimicrobiens se montrent efficaces sur l'ensemble des microorganismes. La sensibilité relative des germes sera fonction de leur structure (espèce), de leur composition et de leur environnement. Le plus souvent, ce sont des réactions affectant le génôme ou des protéines fonctionnelles ou de structure qui sont à l'origine des effets microbicides ou plus rarement microbiostatiques observés.

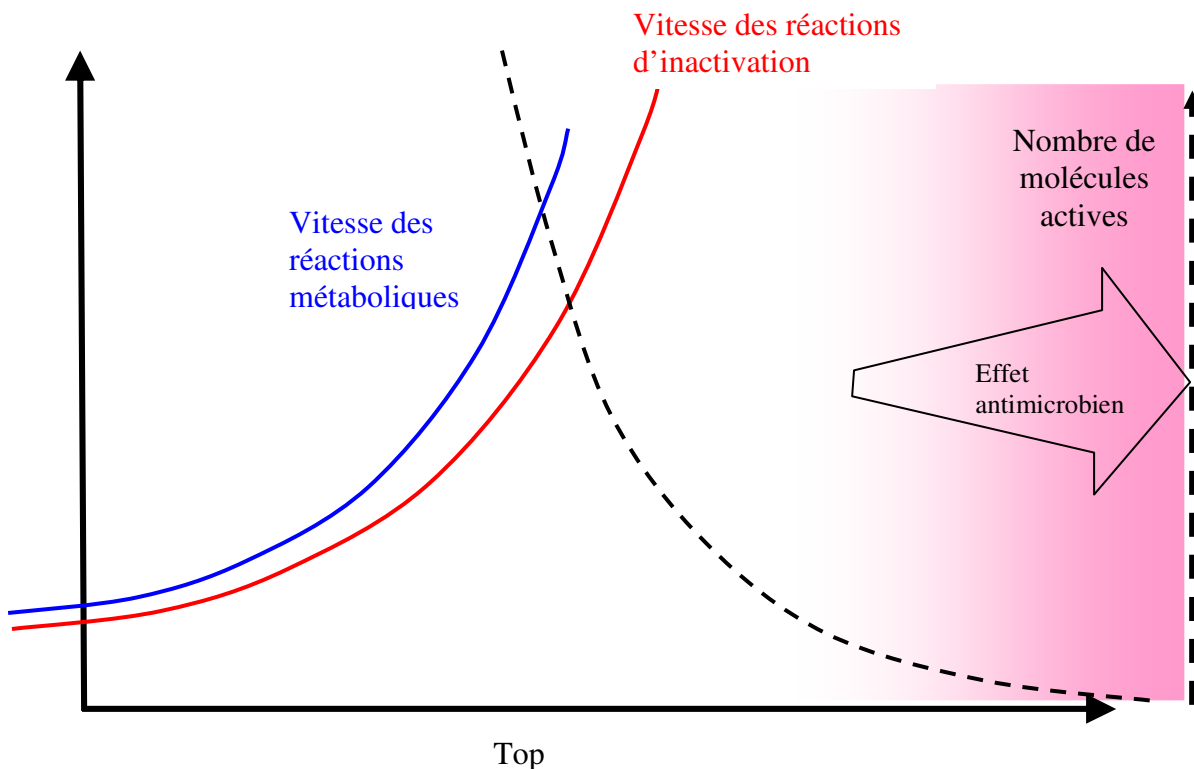
IV- 1. La chaleur

Il s'agit là d'un niveau d'agitation moléculaire. En cinétique, c'est la loi d'Arrhénius* qui permet de quantifier l'effet de la température sur une réaction donnée. Ainsi l'augmentation de la température se traduit d'abord par une augmentation de la vitesse des réactions caractérisant le métabolisme microbien et donc par une augmentation de la vitesse de croissance du germe. En parallèle, cette augmentation de température induit des modifications conformationnelles au niveau de macromolécules impliquées dans la structure ou le métabolisme du microorganisme comme les enzymes.

Il en résulte alors une diminution de la vitesse de croissance, puis, quand le niveau de modification devient incompatible avec l'expression du métabolisme, à un arrêt de cette croissance et enfin à la mort quand le niveau de transformations irréversibles atteint une valeur seuil.

| Réactions métaboliques | Réactions de modifications/altérations |
|---|---|
| $A \xrightarrow{\text{Enz}_1} B$ $B + C \xrightarrow{\text{Enz}_2} D$ <p>etc</p> $\text{ADN} \xrightarrow{\text{etc}} \text{ARN}_m$ | $\text{Enz}_1 \longrightarrow \text{Enz}_1 D$ $\text{Enz}_2 \longrightarrow \text{Enz}_2 D$ |

* La loi d'Arrhénius donne : $k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{Rt}}$ et la représentation $\log k = f(1/T)$ donne une droite de pente $-\frac{E_a}{R}$



Pour obtenir des effets antimicrobiens significatifs il faut donc se placer dans des zones de t° pour lesquelles la vitesse de multiplication (résultante de 2 courbes) est égale à 0.

IV.1.1. Terminologie - Définitions

1 - **La pasteurisation** permet essentiellement la “destruction” des formes végétatives des microorganismes pathogènes et/ou responsables de certaines altérations, microorganismes présents dans l'aliment. Elle conduit ainsi à la “destruction” des moisissures, levures et bactéries à Gram négatif. La plupart des germes sporulés résistent au traitement et certaines bactéries à gram positif ne sont que partiellement détruites (*Streptococcus* et *Lactobacillus* du lait par exemple).

La pasteurisation est généralement pratiquée à des températures inférieures à 100°C . Elle est effectuée sur des produits relativement sensibles à la chaleur (jambon, jus de fruits, lait, beurre, foie gras etc ...). Comme il est probable qu'il reste dans les produits traités des germes vivants, ces produits sont qualifiés de semi-conserves, leur conservation, de durée peu importante, étant assurée immédiatement après pasteurisation soit par réfrigération soit par congélation. Les couples temps/température permettant de

pasteuriser les aliments varient entre 30 min à 65°C (lait, certaines boissons fruitées, crèmes glacées) et 1 h à 90°C (aliments à moyenne ou faible teneur en eau).

Les microorganismes “tests” permettant de concevoir un traitement de pasteurisation sont ceux qui sont “pathogènes” et très thermorésistants sous leur forme végétative. C’est ainsi que *Mycobacterium tuberculosis* et *Streptococcus faecalis* ont été pris comme modèles, *Streptococcus faecalis* étant plus universellement adopté en raison d’une part de sa probabilité de présence dans les aliments non nulle et d’autre part par sa plus grande facilité de culture. Les paramètres de résistance à la chaleur sont indiqués en IV.1.2. La pasteurisation doit donc théoriquement permettre une réduction d’une charge initiale de *S. faecalis* de 10^{12} à 1 cellule par unité de volume ou de poids du produit considéré (ml ou g).

2- La stérilisation par la chaleur correspond à un traitement thermique permettant, au plan microbiologique “d’éliminer” tous les microorganismes pathogènes, y compris ceux qui sont sous forme sporulée et pratiquement la plupart des autres germes susceptibles de contaminer le produit traité.

Les conserves alimentaires stérilisées présentent donc une très grande stabilité et seules des réactions chimiques peuvent contribuer à diminuer leur durée de conservation. Le qualificatif de stérile signifie qu’il est impossible de détecter des microorganismes revivifiables par des méthodes de culture usuelle (ou que le nombre de survivants est si faible qu’il ne présente aucune signification dans les conditions de conservation).

Les couples temps/température permettant de stériliser les produits alimentaires ou autres varient entre 10 min à 115°C et 30 min à 121°C. Des couples temps/température à effets antimicrobiens équivalents sont présentés en IV.1.2.

Les microorganismes test permettant de concevoir un traitement de stérilisation sont donc des germes “pathogènes” sous leur forme sporulée. En technologie alimentaire la spore modèle adoptée est celle de *Clostridium botulinum*, la stérilisation ayant alors pour objectif de réduire une population théorique de cette spore de 10^{12} à 1 (par unité de volume ou de poids). En raison du risque lié à la manipulation de spores de *Clostridium botulinum*, ce sont les spores de *Clostridium perfringens* ou mieux de *C. sporogenes* qui sont choisies comme modèle. Cependant, la nécessité de culture en anaérobiose de ces germes fait que ce sont parfois des spores de *Bacillus* (*B. Stearothermophilus* ou *B. thermosaccharolyticum*), cultivables en aérobiose qui sont choisies.

3 - La tyndallisation

Il s’agit d’un traitement thermique équivalent à des pasteurisations répétitives séparées par des passages à des températures voisines de 30 à 40°C de l’ordre de 10 à 24 h. Au cours de la pasteurisation, seules les formes végétatives sont inactivées tandis qu’au cours des incubations à 30-40°C pendant 10 à 24 h successives à la pasteurisation, la plupart des spores thermo-résistantes sont à même de germer en formant des cellules végétatives qui sont alors inactives par la pasteurisation suivante.

4 - L’ébullition

Ce traitement couramment pratiqué peut être considéré comme une “super pasteurisation”. Il ne détruit pas les formes sporulées et il est souvent constaté que dans ces conditions, la germination des spores est favorisée au cours du refroidissement.

IV.1.2. Les principaux paramètres d’évaluation des effets des traitements thermiques

Les paramètres cinétiques (k : constante de vitesse de la réaction d’inactivation) et thermodynamiques (E_a : énergie d’activation de la réaction) sont, pour des raisons pratiques et “traditionnelles” substitués par les paramètres suivants :

1. Le temps de réduction décimale D. Il s'agit du temps, pour un microorganisme donné dans un milieu défini et à une température précisée, permettant de réduire de 90 % le nombre de microorganismes. Pour des températures en °C les valeurs de D sont les suivantes :

| Formes végétatives | D ₆₀ (sec) | D ₆₅ (ses) | D ₈₅ (sec) | Formes sporulées | D ₁₂₁ (min) |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 75 | | | <i>Clostridium botulinum</i> | 0,2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 300 | 15 à 130 | 0,002 à 0,04 | <i>Clostridium sporogenes</i> | 1,5 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 900 | | | <i>Bacillus coagulans</i> | 0,05 |
| <i>Salmonella typhimurium.</i> | 0,4 à 2,5 | | | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 2 à 5 |
| <i>Salmonella senftenberg</i> | | 54 | 0,02 | | |
| <i>Yersinia enterocolytica</i> | | 22 | 0,0007 | | |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | | 3 | 0,0002 | | |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | | 1,1 | 0,0007 | | |
| <i>Vibrio cholerae</i> | | 12 à 93 | 0,16 à 30 | | |
| <i>Vibrio parahæmolyticus</i> | | 2,8 | 0,14 | | |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 15 (D ₇₀ = 2,95) | | | | |
| <i>Lactobacillus</i> | | 18 | | Ascospores <i>Penicillium</i> | D _{82,5} = 9,7 |

2. La valeur stérilisatrice F qui est la durée du traitement de stérilisation nécessaire pour obtenir, à 121°C, le niveau de réduction No/N choisi, généralement 10¹²/1 avec des spores de *Clostridium botulinum*. Dans ce dernier cas F = D.12 soit F = 2,5 min.

3. La valeur pasteurisatrice VP est la durée du traitement de pasteurisation permettant d'obtenir, à 70°C, le niveau de réduction No/N choisi, avec un microorganisme sous forme végétative (généralement *Streptococcus faecalis*).

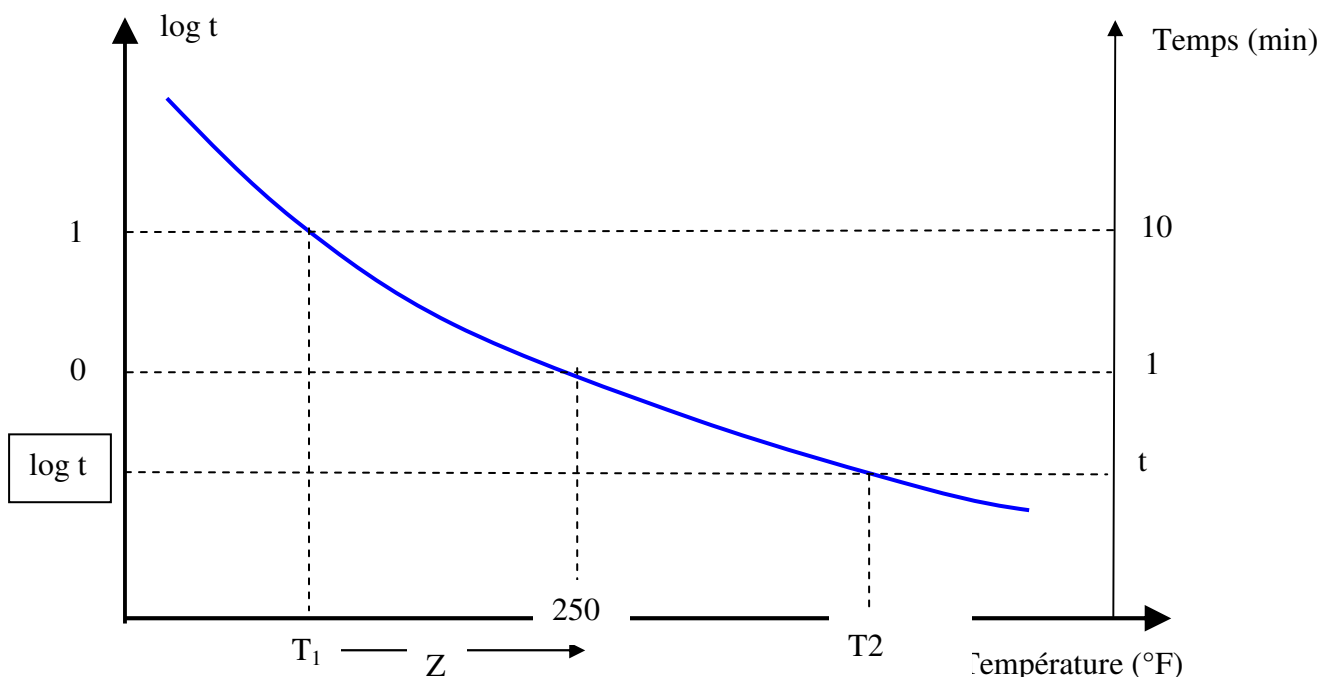
4. La valeur Z qui est l'écart de température (exprimé usuellement en °F pour la stérilisation et en °C pour la pasteurisation) permettant de réduire de 90% la durée du traitement pour obtenir un même niveau d'inactivation choisi.

5. Expression mathématique

A partir de la figure ci-après il est facile d'établir la relation :

$$\frac{1}{Z} = \frac{\text{Log } F - \text{Log } t}{T_2 - 250}$$

(En admettant que dans l'intervalle considéré la courbe log t = f (t°) est une droite). On a la même équation en substituant F et VP)



De l'équation on tire :

$$\text{Log} \frac{F}{t} = \frac{T_2 - 250}{Z} \quad \text{soit} \quad F = t \cdot 10^{\frac{T_2 - 250}{Z}} \quad \text{V.P.} = t \cdot 10^{\frac{T_2 - 70}{10}}$$

Quand un produit alimentaire, conditionné en boîtes ou en bouteilles, est soumis à un traitement thermique, sa température n'atteint pas instantanément la température du milieu chauffant. Le transfert de chaleur entre le milieu chauffant et l'aliment sera rapide s'il se fait par convection (produits liquides peu visqueux), lent s'il se fait par conduction (viandes, poissons, produits visqueux etc.) et intermédiaire dans le cas de produits solides dispersés dans une phase aqueuse (plats en sauce, petits pois, lentilles, etc.). La mesure des variations de température dans une boîte au cours de son chauffage est réalisable par des thermocouples. Il apparaît ainsi que pour calculer une valeur stérilisatrice ou pasteurisatrice, il faut tenir compte au temps t_x à la température T_x de la contribution à l'effet antimicrobien du couple " t_x-T_x ".

Il est donc nécessaire de calculer l'intégrale :

$$F = \int_0^t 10^{\frac{T_2 - 250}{Z}} \cdot dt \quad \text{V.P.} = \int_0^t 10^{\frac{T_2 - 70}{10}} \cdot dt$$

IV.1.3. Facteurs de résistance à la chaleur

En général, la plupart des microorganismes sous forme végétative sont "inactivés" en milieu aqueux ou très hydraté après quelques secondes à 100°C. Parmi les nombreux facteurs de variabilité dans la réponse à la chaleur il est possible de citer :

- la teneur ou **l'activité de l'eau**. Plus cette teneur est faible et plus la résistance apparente du germe est élevée. C'est ainsi que la plupart des microorganismes ont une sensibilité maximale à la chaleur en milieu aqueux.
- la **présence de matières organiques**
 - lipides et protéines : leur présence augmente généralement la résistance thermique de la plupart des germes par des mécanismes différents : isolant naturel, isolant par coagulation.
 - sels : leurs effets sont surtout fonction de leur concentration et de leur nature; s'ils diminuent dans le produit de façon notable l'activité de l'eau, il augmentent la résistance.
 - glucides (cf a_w)
- **pH**. La résistance maximale des microorganismes se situe généralement au voisinage de leur pH_{op} de croissance. Pour les spores de *Clostridium botulinum* les valeurs de D en fonction du pH sont respectivement de :

| | |
|--------|--------------|
| pH = 4 | D = 0,12 min |
| pH = 5 | D = 0,28 |
| pH = 6 | D = 0,5 |
| pH = 7 | D = 0,55 |

- la **charge initiale**
- **l'âge**: la résistance diminue le plus souvent avec l'âge, mais il n'est pas rare de constater le phénomène inverse.
- la **température optimale de croissance** : la résistance à la chaleur est d'autant plus grande que la température optimale de croissance est élevée

IV.1.4. Technologies (cf cours techno)

- a) Pasteurisateurs et pasteurisation basse (généralement 60°C pendant 10 à 30 minutes) et haute (UHT ; 75 à 90°C pendant quelques secondes)
- b) stériliseurs et stérilisation basse (généralement 115 à 120°C pendant 10 à 30 minutes) et haute (UHT; 140 à 145°C pendant quelques secondes)
- c) Fours (chaleur sèche-four Pasteur)

Pour certains matériels ou objets “résistants” à la chaleur (verrerie par exemple) et dont l’hydratation n’est pas souhaitable , la chaleur sèche est utilisée pour obtenir la stérilisation .Les fours Pasteur ainsi utilisés sont en fait des enceintes chauffées par effet joule ; les températures de traitement sont généralement voisines de 160 à 180°C et les temps de traitement sont voisins d’une heure.

Le contrôle de stérilité est généralement réalisé par des “kits” . Certains utilisent des spores de *Bacillus stearothermophilus* ou de *Bacillus subtilis* respectivement pour contrôler l’efficacité des traitements en milieu humide ou en milieu sec .

IV-2. Radiations

IV.2.1. Radiations électromagnétiques

Il s’agit de radiations dont l’énergie est proportionnelle à la fréquence du rayonnement ou inversement proportionnelle à la longueur d’onde de la radiation. Cette énergie est donnée par la relation :

$$w = h\nu = hc / \lambda$$

dans laquelle h est la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide, ν la fréquence et λ la longueur d’onde.

Ainsi, plus la longueur d’onde sera petite et plus l’énergie mise en jeu sera élevée. Les longueurs d’onde de radiations électromagnétiques sont indiquées ci-après :

| | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| infra-rouge | > 800 nm |
| visible | 400 à 800 nm |
| ultra-violet | 10 à 400 nm |
| rayons X | 0,1 - 10 nm |
| rayons γ | 0,1 - 0,001 nm |
| rayons cosmiques | < 0,001 nm |

Pour les rayonnements **ultra-violet**, la région active du spectre se situe entre 260 et 280 nm. Ce sont souvent les composés aromatiques qui “absorbent” l’énergie de ces rayonnements ; parmi les composés aromatiques présents dans les protéines microbiennes, ce sont surtout le tryptophane et à un degré moindre la phénylalanine et la tyrosine qui sont à l’origine des effets observés. Dans les acides nucléiques (ADN ou ARN) ce sont les bases puriques et pyrimidiques qui sont impliquées dans les phénomènes antimicrobiens d’irradiation UV. Les effets ionisants faibles mais efficaces contribuent aussi à l’effet antimicrobien ; ces effets sont à l’origine de la formation d’**ozone** à partir d’oxygène.

L’utilisation des UV permet la décontamination de salles ou de hôtes plutôt que leur stérilisation. Appliqués au traitement des eaux, ils ne conduisent qu’à des résultats passables (en raison surtout de leur très faible pénétration qui est de l’ordre de quelques mm). Ils ne sont efficaces que sur les zones illuminées et pour un générateur UV donné l’énergie irradiée varie avec la puissance 3 de la distance à la

source. Les effets mutagènes cutanés ou les effets irritants au niveau des muqueuses (au niveau oculaire en particulier) nécessitent des protections importantes pour les “utilisateurs” de ce type de radiations.

Les rayons X et γ sont considérés comme des moyens de stérilisation à froid des conserves alimentaires ou autres produits. Le coût élevé et l’“image médiatique” de tels traitements ainsi que l’ionisation à laquelle ils aboutissent sont aujourd’hui à l’origine de leur utilisation limitée. Néanmoins il faut savoir que l’irradiation X ou γ est utilisée depuis plus de 25 ans pour stériliser du matériel médico-chirurgical ou des emballages et matières premières employées dans les industries pharmaceutiques ou en cosmétologie. Ses premières applications importantes en industries agro-alimentaires remontent aux années 1990.

a) Les rayonnements ionisants

Il s’agit de rayonnements électromagnétiques, de même nature que les rayonnements infra-rouge ou visibles, dont l’énergie est suffisamment élevée pour éliminer des électrons des couches périphériques ou profondes des atomes et molécules ce qui conduit à la formation d’ions (d’où le terme ionisation). En raison de leur énergie relativement faible, les rayonnements ultra-violets ne sont que faiblement ionisants. Par contre les rayons X et surtout γ , d’énergie élevée, sont qualifiés de rayonnements ionisants. Cependant, leur énergie ne leur permet pas d’atteindre le noyau des atomes : ces rayonnements ne sont pas activateurs.

Rappelons que l’**irradiation** est un terme générique très vague qui couvre la gamme des longueurs d’onde allant de l’infra-rouge aux rayons cosmiques. L’irradiation ionisante résulte donc de l’utilisation de rayonnements U.V. mais surtout X et γ et n’a rien de commun avec la **radioactivité**. En effet, la radioactivité résulte d’une instabilité des noyaux de certains éléments qui émettent spontanément des photons (radiations électromagnétiques) et/ou des particules (électrons, neutrons, particules α , etc...). La contamination radioactive résulte généralement d’un dépôt d’isotopes radioactifs sous forme de poussière ou de liquide sur un produit non radioactif.

Une des propriétés les plus intéressantes des rayonnements X et γ est que leur application à un produit donné ne provoque qu’une très légère élévation de température.

b) Les unités

- L’**activité** ou **puissance** des sources de rayonnements s’exprime en Curie (Ci).

Le Curie est le nombre de désintégrations qui se produit par seconde dans 1 g de radium soit environ $3,7 \cdot 10^{10}$ désintégrations par seconde.

L’énergie des radiations émises dépend de la source ; ainsi 1 Ci de ^{60}Co correspond à 15 mW, ce qui permet de traiter environ 10 Kg de produits agro-alimentaires. Le Becquerel (Bq) est l’unité officielle d’activité et correspond à 1 désintégration par seconde.

Dans le cas où l’ionisation est obtenue par des particules accélérées à très grandes vitesses, la puissance est exprimée en KW.

- Les **doses** s’expriment en **Gray (Gy)** et correspondent à une énergie par unité de poids (1 Gy = 1 J/kg). La dose à appliquer dépend du but recherché (tableau 4).

- Le **débit de dose** correspond à la vitesse avec laquelle on délivre la dose ; il s’exprime en Gray par unité de temps.

Traitement recherché Dose en kGy

| | |
|--|------------|
| inhibition de la germination de bulbes et tubercules | 0,04 - 0,1 |
| Inhibition de la reproduction des insectes | 0,03 - 0,2 |
| mort des insectes (désinsectisation) | 1-3 |
| radicidation ₁ | 1-4 |
| radurisation ₂ | 1-6 |
| radappertisation ₃ | 15-50 |
| mort des virus | 20 |
| inactivation d'enzymes | 60 |

- 1 : la radicidation correspond à l'élimination de germes pathogènes
 2 : la radurisation correspond à l'élimination des microorganismes responsables de réactions de détérioration
 3 : la radappertisation correspond à la stérilisation.

c) Les générateurs.

Les sources de radiations ionisantes utilisées actuellement sont :

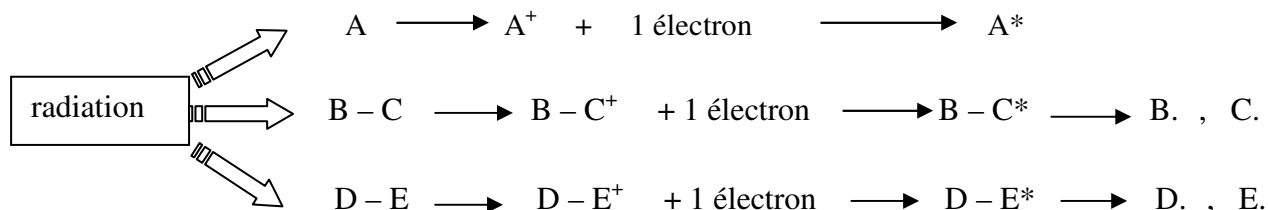
- des **isotopes** comme le cobalt 60 (^{60}Co) ou le césium 137 (^{137}Cs) qui sont des émetteurs γ . Le ^{60}Co est, en l'état actuel de la technologie, le plus utilisé; il est fabriqué en 5 à 10 mois dans des réacteurs à partir de ^{59}Co . Le ^{60}Co est radioactif et émet un rayonnement β - peu énergétique (rayonnement d'électrons) et deux rayonnements γ très énergétiques d'environ 1,25 MeV (méga électron volt : $1\text{KWh} = 2,25 \cdot 10^{19} \text{ MeV}$) qui ne perdent qu'environ 1,6% de leur énergie dans la traversée de 40 cm d'eau. La période du ^{60}Co est d'environ 5 ans, c'est à dire qu'il perd en 5 ans la moitié de son activité. Pratiquement cela signifie que les sources de ^{60}Co seront utilisables une dizaine d'années; ensuite elles seront éliminées avec les déchets des centrales nucléaires qui sont vitrifiées et stockés. Le ^{60}Co pur a une activité de 1150 Ci / g; celui utilisé dans l'industrie est mélangé avec du cobalt ordinaire non radioactif et possède une activité de 30 à 100 Ci / g. Il est usiné en plaquettes ou pastilles qui sont conditionnées dans des doubles enveloppes étanches souvent sous forme de barreaux. Ces sources sont disposées sur des rateliers et forment le générateur-émetteur de rayonnement de l'irradiateur.

- des **générateurs de rayons X** qui sont obtenus par chocs d'électrons préalablement accélérés sur une cible. Le rendement de transformation de l'énergie cinétique de l'électron ($w = 1/2 mv^2$) en énergie électromagnétique ($w = hv$) est inférieur à 7%.

- des **accélérateurs de particules**. Dans ce cas, l'ionisation est obtenue par "bombardement" du produit par des électrons accélérés à très grande vitesse (plusieurs milliers de km/sec). L'énergie cinétique de ces particules doit être de l'ordre de 5 à 10 MeV pour que ce rayonnement soit utilisable en industries agro-alimentaires. En raison de leur nature corpusculaire, ils sont moins pénétrants que les rayonnements γ ou X. Ainsi, un rayonnement électronique de 1 MeV sera totalement absorbé dans 0,5 cm d'eau.

d) Effets des radiations ionisantes.

L'effet chimique primaire du rayonnement consiste en un arrachement d'électrons de la matière irradiée. Ces électrons acquièrent une grande énergie (de l'ordre du MeV) et vont interagir avec les électrons périphériques des atomes et molécules pour donner des réactions secondaires et des électrons secondaires etc...



Il apparaît alors des atomes ou des molécules excitées qui donnent naissance à des radicaux libres responsables des effets chimiques ou biologiques observés au cours de l'irradiation. Ces radicaux libres sont très réactifs et peuvent :

- soit former entre eux et au hasard des rencontres de nouvelles liaisons (donc de nouvelles espèces moléculaires)
- soit rompre d'autres liaisons et induire de nouveaux radicaux libres.

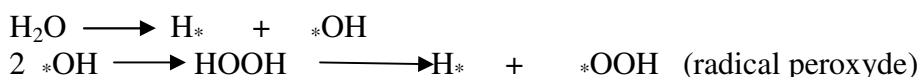


(dans cet exemple, 4 espèces moléculaires nouvelles sont créées : B-D, B-E, C-E, et C-D)

Par exemple, la radiolyse de la glycine qui est le plus simple des acides aminés constitutifs des protéines fournit un très grand nombre de dérivés : H_2O_2 , H_2 , NH_3 , CO_2 , $HCHO$, $HCOOH$, CH_3COOH , $CHOCH_2COOH$, $HOOCCH_2CH_2CH(COOH)NH_2$.

1) Actions sur les molécules d'eau.

L'eau est un composant important de la plupart de nos aliments. Son irradiation γ conduit à la formation de radicaux libres oxydants tels que les radicaux peroxydes. Ces radicaux sont alors capables d'oxyder tous les composants oxydables de l'aliment (lipides insaturés, vitamines A, C, E et B, acides aminés soufrés, etc...)



Pour minimiser ce phénomène, il est conseillé soit de déshydrater soit de congeler le produit avant de l'irradier. Dans ce dernier cas, c'est un effet cage qui limitera l'action des $\cdot OOH$

2) Actions sur les molécules organiques.

- Les sucres simples ne sont pas notablement modifiés jusqu'à 10 kGy.
- Les amidons sont dépolymérisés à partir de 5 kGy avec production de glucose, maltose, dextrines, etc.
- Les protéines sont peu affectées jusqu'à 10 kGy. Il se produit néanmoins des hydrolyses de liaisons peptidiques et des libérations de composés soufrés (H_2S , CH_3SCH_3) malodorants.
- Les lipides insaturés subissent des oxydations et les réactions de rancissement sont importantes.
- Les vitamines A et E sont sensibles au traitement mais peuvent être en grande partie préservées par congélation préalable du produit. La vitamine B₁ est la plus radio-sensible. La vitamine C s'oxyde d'abord en acide déhydroascorbique qui possède l'activité vitaminique C.
- Les enzymes sont peu affectées et les réactions défavorables qu'elles sont susceptibles de catalyser peuvent se poursuivre dans l'aliment irradié.
- Les toxines microbiennes ne sont pas détruites aux doses habituelles.
- Les complexes pecto-cellulosiques des aliments végétaux subissent des hydrolyses partielles dont l'effet sur la texture peut être très important (perte de fermeté des fruits irradiés)
- Les acides nucléiques (ADN et ARN) subissent des hydrolyses partielles qui rendent impossibles la lecture et l'expression du code génétique. Par ailleurs, il peut se former des liaisons entre bases qui contribuent à la non-fonctionnalité de ces molécules. Ce sont surtout ces altérations des acides nucléiques

qui empêchent la division cellulaire et par conséquent qui “inactivent” les insectes, germes, microorganismes et virus .

e) Actions sur les microorganismes.

Les effets des radiations sur les microorganismes sont fonction de la dose (intensité-temps) de radiations absorbées et sont, dans leur interprétation, à rapprocher des effets de la chaleur (température-temps) déjà décrits. La cinétique de destruction suit une loi comparable à celle énoncée avec la température. Les doses de réduction en KGy permettant de réduire de 90% le nombre de germes vivants sont indiquées, pour certains microorganismes, dans le tableau ci-dessous.

| microorganisme | dose (KGy) | microorganisme | dose(KGy) |
|-------------------------------|------------|---------------------------------------|--------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0,1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,8 - 1,9 |
| <i>Lactobacillus</i> | 0,1 - 0,2 | <i>Clostridium botulinum</i> type E | 1,2 - 3 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0,15 - 0,3 | spores de <i>Cl. botulinum</i> | 3,5 - 5 |
| <i>Shigella</i> sp | 0,25 - 0,4 | <i>Micrococcus radiodurans</i> | 5 - 8 |
| <i>Salmonella</i> sp | 0,5 - 1 | levures | 0,8 - 1,2 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 0,75 - 1 | moisissures | 0,4 - 1,3 |
| <i>Moraxella</i> | 0,8 - 1,3 | poliovirus | 14 |

Aux doses habituelles utilisées pour traiter les produits carnés et de nombreux produits végétaux (2 à 4 kGy) , une réduction correspondant à environ 12 D est obtenue pour la plupart des germes pathogènes, ce qui permet un bon assainissement . Par contre, le nombre de spores de *Clostridium botulinum* et des cellules de *Staphylococcus* et *Moraxella* sera insuffisamment réduit et de ce fait les produits seront potentiellement dangereux. La destruction de ces microorganismes requiert des doses 10 fois plus importantes soit des doses d'environ 20 à 50 kGy. Dans ce cas, les altérations apportées à l'aliment sont importantes.

f) Technologies.

La protection des personnels assurant le fonctionnement des irradiateurs est principalement assurée par des enceintes épaisses et absorbantes des rayonnements (ciment, plomb). La chambre d'irradiation est isolée par des sas et ne doit rester accessible qu'aux produits.

Il existe divers types d'irradiateurs γ qui diffèrent les uns des autres essentiellement par le mode de présentation à la source émettrice (balancelles, palettes, en vrac sur des convoyeurs). L'aliment emballé ou non est véhiculé par des balancelles ou des palettes jusqu'à la chambre d'irradiation contenant la source. Au cours de son passage à proximité de la source, il reçoit une dose qui est fonction de la puissance, de la distance et du temps d'irradiation. Pour éviter que l'irradiation ne se fasse que par un des côtés de la denrée, il est procédé à un retournement à la fin du premier passage.

Les possibilités d'irradiation de nos aliments varient énormément en fonction des pays. En France, cette technologie de conservation est autorisée par exemple sur les pommes de terre, oignons, échalotes et aulx à des doses comprises entre 0,075 et 0,15 kGy pour empêcher la germination, pour la radappertisation des épices, les légumes déshydratés ou encore des mélanges de céréales à des doses inférieures à 11 KGy. Le principal avantage apporté par cette technologie de conservation réside dans le fait que la température ne varie pas au cours du traitement : il s'agit d'un procédé “à froid”.

Toutes les nombreuses études nutritionnelles et toxicologiques qui ont été réalisées à ce jour n'ont pas permis de mettre en évidence d'effets “très” défavorables aux doses utilisées.

IV.2.2. Radiations électroniques (cf IV-2-1-c)

Les électrons obtenus par effet thermoélectrique puis accélérés à très grande vitesse par un champ électrique ont un pouvoir de stérilisation voisin de celui des rayons γ . De tels rayonnements sont orientables à volonté. Leur pouvoir pénétrant est plus faible que celui des rayons γ . Leur principal défaut est d'altérer les substances organiques soumises à leur action.

IV.2.3. Radiations soniques.

Les ultra-sons tuent les microorganismes en suspension par un effet "mécanique" de vibration. De telles radiations sont surtout utilisées comme moyen de rupture des structures bactériennes et/ou d'extraction des composants cellulaires. Transmis dans les milieux matériels et pas dans le vide il permettent d'atteindre des zones difficilement accessibles à d'autres agents antimicrobiens. Leur effet est, comme pour les autres types de radiations, inversement proportionnel à leur longueur d'onde ou proportionnel à leur fréquence.

IV . 3. Elimination mécanique.

IV.3.1. Filtration stérilisante .

Il est possible de réaliser des filtrations stérilisantes en utilisant des supports poreux organiques (dérivés de la cellulose, polyamide, téflon, etc) ou minéraux (filtres d'amiantes, d'alumine, de porcelaine, de verre fritté, amiante, etc .) au niveau desquels la taille des "pores" est parfaitement contrôlée et de dimension inférieure à celle de la plupart des microorganismes à retenir ($\varnothing \leq 0,5 \mu\text{m}$).

Ces méthodes restent néanmoins limitées aux liquides peu chargés en matières organiques en suspension (boissons type bière, vin et certains jus de fruits). Elles présentent l'avantage de ne pas modifier les qualités organoleptiques sauf dans quelques cas où des rétentions de composés d'arômes sur le support se produisent.

Il existe des systèmes industriels tubulaires ou multitubulaires relativement performants . Réalisés en alumine ou avec d'autres minéraux, ils supportent des débits et pressions élevés et leur nettoyage à l'hydroxyde de sodium ou aux acides est possible.

Au niveau du **Laboratoire**, ce sont surtout des filtres circulaires en dérivés de cellulose qui sont utilisés. Stérilisables par la chaleur, leur diamètre varie du cm à une dizaine de cm. Un équipement adapté permettant la filtration est proposé par de nombreux fabricants. Il est alors possible de **stériliser à froid** des solutions de produits thermo-sensibles (vitamines) ou des mélanges de produits (glucides réducteurs - protéines) dont l'intégrité est incompatible avec la stérilisation par la chaleur (réaction de Maillard le plus souvent). Il faut signaler enfin la possibilité d'emploi de ces méthodes pour des **numérations** de diverses flores ou des recherches de germes présents en très petit nombre dans de très grands volumes liquides.

IV.3.2. Centrifugation.

La centrifugation au dessus de 5000 g permet de diminuer la charge microbienne (**bactofugation** en industrie laitière) ce qui rend beaucoup plus efficace la pasteurisation. Pour les laits non stérilisables :

- à 60°C, 95 % des spores sont éliminés par réaction avec des agglutinines associées au globule gras et se retrouvent donc dans la phase légère
- à 80°C, les agglutinines sont rapidement dénaturées et perdent leur activité en une dizaine de minutes ; 98 à 99 % des spores sont alors éliminées dans le culot.

IV - 4 . Micro-ondes

L'effet des micro-ondes sur les microorganismes présents dans les aliments résulte de l'"agitation" des dipôles que constituent surtout les molécules d'eau puis par conduction / convection sur celle des autres

molécules. L'agitation moléculaire observée est alors comparable à celle obtenue par d'autres moyens (combustion, effet joule, induction, vapeur etc) et la "chaleur" obtenue peu s'analyser d'une façon très voisine de celle décrite lors de l'étude des effets de la température.

IV . 5 . Hautes pressions en présence ou non de gaz

La plupart des microorganismes sont sensibles aux hautes pressions. Cela résulte de déstructuration irréversibles de structures cellulaires. Il faut des pressions voisines de 5000 bar pour espérer, au cours du cycle pressurisation / dépressurisation, obtenir des contraintes mécaniques de déformation suffisantes pour casser des structures cellulaires et inactiver ainsi les micro-organismes. A ces pressions seules des formes végétatives sont sensibles à ce type de traitement.

Les **traitements en présence de gaz sous pression** se traduisent selon les gaz, les microorganismes et les pressions, par des effets antimicrobiens plus ou moins marqués.

V. AGENTS CHIMIQUES.

Tous les composés chimiques possédant un effet antimicrobien ne sont pas utilisables comme antiseptiques ou désinfectants. Certains, comme les fluorures ou les cyanures sont de puissants poisons cellulaires dont la toxicité interdit l'emploi. D'autres, tels que les antibiotiques et les sulfamides sont traités à part en raison de leur rôle thérapeutique.

V.1. Les antiseptiques, les désinfectants et les conservateurs alimentaires.

Le choix d'un antimicrobien dépend de l'usage auquel il est destiné, de son activité, de sa toxicité, de sa stabilité, de son pouvoir corrosif ou colorant, de son odeur etc... En l'état actuel de nos connaissances, l'antimicrobien idéal n'existe pas.

V.1.1. Mode d'action.

Les mécanismes biochimiques impliqués dans l'effet ou les effets antimicrobiens des antiseptiques, désinfectants, antibiotiques ou des conservateurs alimentaires sont souvent multiples et d'une grande diversité.

Les antimicrobiens agissent soit en altérant une structure fondamentale et vitale de la bactérie, soit en inhibant son activité métabolique. Il n'est donc pas possible de présenter une analyse exhaustive des différents systèmes antimicrobien / milieu / microorganisme. Néanmoins des grandes classes de mécanismes d'action peuvent être décrites :

- oxydation de protéines, de vitamines
- coagulation des protéines ; la perte de certaines ou de toutes les activités enzymatiques par dénaturation signifie la mort du microorganisme. La chaleur, les alcools coagulent les enzymes.
- formation de complexes avec des macromolécules : complexes avec des métaux lourds
- altération des acides nucléiques : les colorants basiques (bleu de méthylène, violet de gentiane) réagissent avec les acides nucléiques, ce qui conduit à leur inactivation.
- altérations de la paroi de la membrane : le lysozyme hydrolyse la paroi des bactéries à Gram positif ; ces dernières éclatent alors sous l'effet de leur pression osmotique interne.
- actions sur le métabolisme ; elles correspondent à des inhibitions enzymatiques. Il s'agit en fait de la résultante d'effets déjà décrits plus globalement ; ainsi, les sels de métaux lourds (mercure et dérivés) sont susceptibles de se combiner avec les groupements SH des enzymes ; le peroxyde d'hydrogène oxyde les groupements SH en SO_3H , S-CH_3 en sulfoxyde ou sulfone, les noyaux indole en cynurénine etc., ce qui conduit à une perte d'activité.

- altérations de la membrane cytoplasmique : elles entraînent des pertes de substances, une perte de spécificité de “filtre” une désorganisation du métabolisme. Certains tensioactifs sont particulièrement actifs sur les composants hydrophobes de la membrane cytoplasmique qui est de nature lipoprotéique .

V.1.2. Classification.

La classification basée sur la parenté chimique, le mode d'action ou le mode d'utilisation de ces substances chimiques ne peut être que limitative.

V.1.2.1. Agents oxydants.

a) Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée, HOOH) est un antiseptique efficace. A 3 % (10 volumes) en solution aqueuse, il s'agit d'un bon désinfectant. Son utilisation est limitée en raison de sa décomposition rapide. Il s'agit d'un composé inodore, incolore.

Ce peroxyde d'hydrogène conduit à l'oxydation des résidus de cystéine et de méthionine des protéines, celles-ci perdant alors leur fonction biologique. D'autres substances sont aussi oxydées dans ces conditions : ainsi des peroxydes apparaissent dans les lipides insaturés ; certaines vitamines (surtout A, D, C, B1) sont oxydées au cours de ce traitement. Les peroxydes permettent par ailleurs de “blanchir” de nombreux composés. Ce dérivé est autorisé aux USA pour stériliser des laits destinés à la fabrication de certains fromages. Sa disparition du produit après addition est liée à la présence d'une activité catalasique normalement présente dans les laits crus. La mise en évidence du traitement ne peut alors s'effectuer que par évaluation des oxydations résultant du traitement.

En France et en Europe, le peroxyde d'hydrogène permet la stérilisation de certains réservoirs mais surtout celle des emballages de type Tétrapak, le conditionnement des produits liquides stérilisés en vrac se faisant alors en conditions aseptiques.

Les perborates alcalins, les persulfates alcalins, qui en présence d'eau donnent du peroxyde d'hydrogène, sont quelquefois utilisés en hygiène dentaire.

Le temps de contact pour “désinfecter “ avec du peroxyde d'hydrogène à 3 % est de :

| | |
|-------------------------------|------|
| <i>Neisseria gonorrhea</i> | 0,3 |
| <i>Hæmophilus influenzae</i> | 1,5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2,2 |
| <i>Escherichia coli</i> | 3,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 12,5 |
| <i>Candida albicans</i> | 21,2 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 45,3 |

b) Le chlore et ses dérivés

Le chlore gazeux et surtout ses dérivés chimiques constituent les **antiseptiques ou désinfectants les plus communs**. Ils sont utilisés pour le traitement des eaux de boisson, de piscine, pour la désinfection des locaux, d'objets contaminés, etc...

• chimie et mécanisme d'action

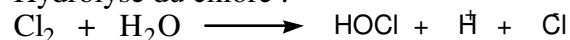
Les formes gazeuses sont difficiles à manipuler.

Le dioxyde de chlore (ClO_2) est environ 2,5 fois plus oxydant que le chlore gazeux. Avec ce dérivé l'oxydation passe par la formation d'acide hypochloreux. L'effet de cette forme de chlore n'est pas diminué par des pH élevés et cet effet dure plus longtemps qu'avec le chlore et n'est pas affecté par l'ammoniac ou les autres formes d'azote.

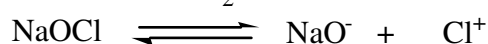
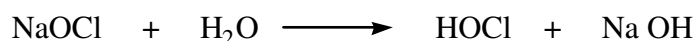
Les composés liquides tels que les hypochlorites et les chloramines sont de loin les composés les plus utilisés. L'hypochlorite de sodium, ou eau de Javel, est d'usage universel et correspond à une solution de chlore dans l'hydroxyde de sodium ($\text{NaOH} + \text{Cl}_2$)

Les mécanismes d'action de ce dérivé du chlore sont complexes et dépendent de la forme active. Ainsi il est possible d'écrire :

Hydrolyse du chlore :



Hydrolyse de l'hypochlorite :



L'acide hypochloreux est électrophile par ses atomes d'oxygène mais surtout de chlore qui est partiellement caractérisable par sa charge +. Il se combine ainsi avec une affinité élevée à des paires d'électrons, ce qui constitue la base des substitutions électrophiles et additions électrophiles avec les atomes de carbone organique ou avec l'azote aminé.

La plupart des composés organiques sont oxydables par le chlore et dérivés qu'il s'agisse d'acides gras, d'esters, de composés aromatiques, d'alcools, d'aldéhydes, d'acides aminés aromatiques, de phénols ou encore de dérivés.

Ø Les composés alimentaires ou microbiens impliqués dans les substitutions électrophiles sont ceux qui contiennent sous forme libre ou combinée les composés suivants : parmi les aromatiques (phénylalanine, tyrosine, acide p-aminobenzoïque, composés phénoliques ou polyphénoliques) et parmi les hétérocycliques (tryptophane, histidine, proline, purines, pyrimidines, acide nicotinique, niacine, pyridoxine, acide benzoïque, antioxydants comme le BHA ou le BHT)

Ø Les composés alimentaires ou microbiens impliqués dans les additions électrophiles sont ceux qui contiennent sous forme libre ou combinée les composés suivants : Les molécules à doubles liaisons conjuguées comme les caroténoïdes ou les xanthophylles, les acides gras insaturés et leurs dérivés, les phospholipides, etc.

Quand du chlore est incorporé à une molécule organique, il augmente la lipophilie ou l'hydrophobicité de celle-ci.

L'effet antimicrobien et sporicide de ces dérivés du chlore diminue quand le pH augmente. Ainsi l'acide hypochloreux possède des effets antimicrobiens beaucoup plus élevés (80 à 100 fois) que les ions OCl^- .

Les augmentations de température ou de concentration augmentent l'effet.

Les spores sont en moyenne 10 à 100 fois plus résistantes que les formes végétatives.

La présence de matières organiques diminue l'effet antimicrobien.

De très nombreux travaux ont été et sont consacrés aux mécanismes antimicrobiens du chlore et de ses dérivés. Une des premières hypothèses avancées concernait les effets de ces produits sur la membrane cytoplasmique par formation de dérivés N-chloro, ce qui se traduit par des altérations du métabolisme cellulaire résultant des changements de perméabilité.

D'autres travaux ont montré que le chlore pénètre rapidement dans la cellule microbienne et réagit avec les composés cytoplasmiques avec formation de dérivés N-chloro toxiques. Du fait de son efficacité à faible concentration, de nombreux auteurs ont suggéré que cet antimicrobien inhibait des réactions enzymatiques clés de la vie cellulaire par oxydation de groupes SH des catalyseurs protéiques.

• Applications

Pour la désinfection des surfaces et matériels dans les industries, l'hypochlorite de sodium est généralement utilisé à des doses de 100 à 300 ppm de chlore actif alors que des doses de 1 à 5 ppm permettent de diminuer les charges microbiennes de surface de certains produits comme les fruits ou les viandes. Pour améliorer sa couleur et ses propriétés boulangères, la farine est soumise à des traitements de chlore gazeux à des concentrations voisines de 1500 à 2500 ppm.

En France, la concentration de ces dérivés est exprimée en degré chlorométriques (le degré chlorométrique correspond au volume de chlore dégagé par kg de produit).

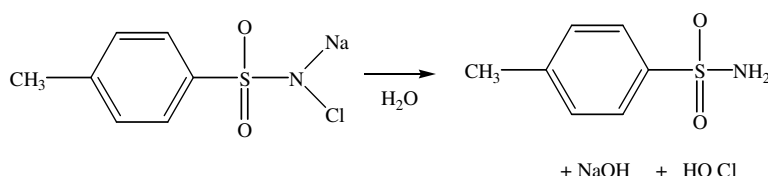
Au laboratoire la sanitation de surfaces peu contaminées est réalisable avec des solutions à 1000 ppm. Les solutions à 2500 à 5000 ppm sont utilisées pour le pot collecteur de pipettes et lames et celles à 10000 ppm pour les zones très contaminées. La stabilité des solutions est mauvaise et la concentration diminue très rapidement (24 heures pour les solutions diluées).

Le dioxyde de chlore permet la stérilisation et la désodorisation de l'eau.

L'étude de la **toxicité** du chlore et dérivés (aigüe ou effets mutagènes) a fait l'objet de nombreuses publications. Ce sont les dérivés chlorés qui se forment au cours du traitement qui sont à l'origine de ces effets (chloroforme, etc.)

Les préparations **antiseptiques** de dérivés du chlore comme les liqueurs de Labarraque ou de Dakin sont préparées en partie avec une dilution d'hypochlorite.

Les **chloramines** (chloramine T) permettent d'obtenir des actions plus durables que celles produites par les hypochlorites, mais leur efficacité est moindre. Elles sont surtout utilisées pour la désinfections d'eau de piscines. Une des réactions probables de ces dérivés est la suivante :



c) L'iode et ses dérivés.

Il s'agit de l'un des désinfectants les plus anciens. Bactéricide et fongicide, il est peu soluble dans l'eau, mais facilement soluble dans l'alcool ou des solutions aqueuses d'iodures de potassium ou de sodium. Les solutions iodo-iodurées (iode et iodure) ou teintures d'iode ou Lugol sont utilisées pour désinfecter les plaies superficielles.

Certains détergents peuvent solubiliser l'iode et lui servir de support : **iodophores**. Les iodophores sont actifs avec 150 ppm d'iode. La solution alcoolique (50%) d'iode à 1500 ppm a une activité sporicide très nette.

Les mécanismes de l'activité antimicrobienne sont à rapprocher de ceux précédemment décrits avec le chlore.

D'autres dérivés d'halogènes comme le fluor ou le brome possèdent des effets antimicrobiens mais sont peu utilisés en raison de leur difficulté de manipulation ou de leur toxicité.

V.1.2.2. Les métaux lourds et leurs sels.

Certains métaux possèdent un effet microbicide important. Ce pouvoir qualifié d'effet oligo-dynamique s'exerce à des doses infimes peut s'expliquer par sa très faible solubilité et la faible ionisation du métal et par l'affinité de ces ions pour les protéines cellulaires.

L'argent et certains de ses dérivés permettent la stérilisation des eaux de piscine, et la préparation de pansements antiseptiques.

Les sels de métaux lourds les plus utilisés sont les sels d'**argent**, de **mercure**, de **cuivre**, de **zinc** et d'**or**.

Leur efficacité est plus grande que celle des métaux correspondants. Ils inactivent la cellule en précipitant les molécules protéiques et plus particulièrement celles dotées d'activité enzymatique ou en se combinant avec les groupements SH.

| | DERIVES | UTILISATIONS |
|----------------|--|--|
| mercure | chlorure mercurique biiodure de mercure cyanure de mercure oxyde de mercure mercurochrome mercryl : mercurobutol merfène : borate de phényl mercure merseptyl : merthiolate de sodium | pommades antiseptiques antisypilitique désinfectant instruments chirurgicaux préparations ophtalmiques antiseptiques de la peau et des muqueuses <i>(conservateur biologique)</i> |
| argent | nitrate en solution 1 % préparations colloïdales | ophtalmie gonococcique du nouveau-né antiseptiques en ORL ou ophtalmo désinfectants en traitement des eaux |
| cuivre | sulfate | puissant antifongique (mildiou de la vigne) pommades , collyres |
| zinc | sulfate | collyre , pommades cicatrisantes |
| or | chlorure ou cyanure | "historiquement antituberculeux" |

V.1.2.3. Les alcools.

Les alcools inférieurs sont utilisables comme agents antimicrobiens ; ils diminuent d'autant plus la constante diélectrique du milieu que leur nombre d'atomes de carbone (nombre de méthylène CH₂) est élevé et donc leur apolarité ou leur hydrophobicité élevée (D = 34 et 26 respectivement pour le méthanol et l'éthanol)).

Classement par effet antimicrobien croissant :



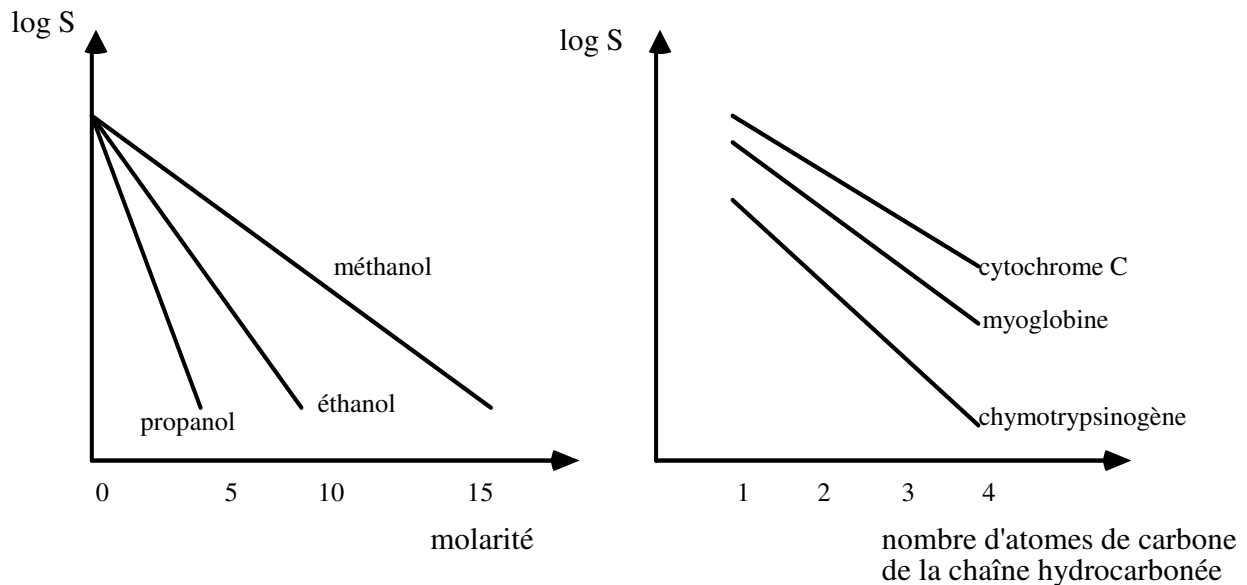
La solubilité dans l'eau devient très faible à partir de C₆



A faible concentration, les alcools provoquent une dénaturation forme globulaire \longrightarrow pelote statistique. Cependant, à haute concentration et sous l'effet de la température une transition forme globulaire \longrightarrow hélice α \longrightarrow pelote statistique intervient. La stabilité de la forme intermédiaire

α -hélice est d'autant plus grande que la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool ou mieux l'hydrophobicité de cette chaîne est élevée.

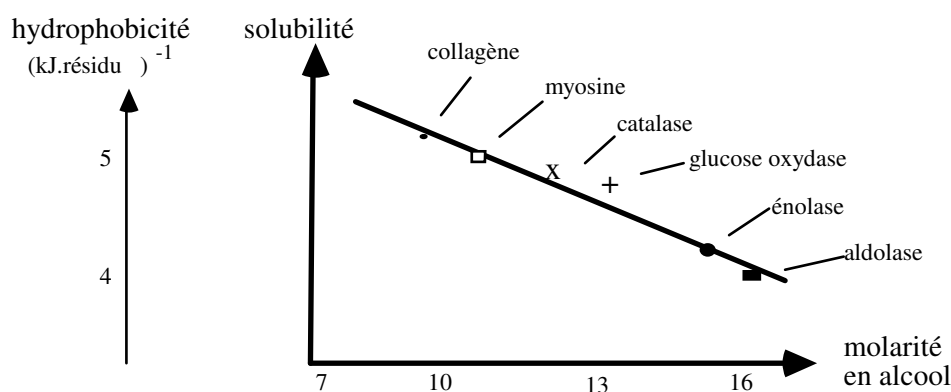
Les effets liés à la dénaturation sont parfois réversibles. Plus la masse molaire de la protéine est élevée et plus sa précipitabilité est grande. La dénaturation des protéines membranaires ou cytoplasmiques à activité enzymatique entraîne la perte de leurs propriétés fonctionnelles et donc la mort du microorganisme si elles sont impliquées dans un mécanisme "fondamental".



Solubilité des protéines en milieu alcoolique et corrélation entre la dénaturation et le nombre d'atomes du carbone de l'alcool et la nature de la protéine

La température joue un rôle déterminant dans les phénomènes de dénaturation/précipitation induits par les alcools. La cinétique de précipitation suit un ordre apparent de 1.

L'**hydrophobicité** de la protéine influence également sa susceptibilité à la dénaturation en milieu alcoolique. Ainsi plus une protéine a une hydrophobicité moyenne élevée (mais aussi une hydrophobicité de surface importante) et plus la concentration optimale en alcool pour la précipiter est faible.



Corrélation entre la susceptibilité à la dénaturation et l'hydrophobicité de quelques protéines.

Pour des teneurs très élevées en alcool, la solubilité de la protéine dénaturée augmente parfois, par interaction entre les groupements hydrophobes démasqués et le solvant.

Les alcools agissent aussi par effet solvant au niveau des composés de la membrane cytoplasmique.

L'**isopropanol** est l'alcool à effet antiseptique le plus utilisé aux USA.

L'**éthanol** présente un effet antiseptique maximum pour des dilutions voisines de 50%. En effet si des bactéries sont présentes dans une plaie au contact de sang ou de lymphes, la coagulation rapide des protéines sanguines ou lymphatiques constituera une barrière physique à la diffusion de l'alcool au contact de certains germes présents dans des zones "profondes". Il faut donc que la vitesse de dénaturation des protéines ne soit pas trop élevée pour permettre à cet agent antimicrobien de se trouver au contact des germes au niveau desquels il agira alors avec une efficacité moins grande que s'il était concentré. L'effet microbicide direct sur le microorganisme reste d'autant plus grand que la concentration en éthanol est élevée. Il est peu actif sur les formes sporulées. Il est utilisé comme désinfectant cutané ; son action est superficielle.

L'éthanol est un **conservateur** alimentaire connu depuis l'antiquité.

Le **méthanol** est moins actif et plus nocif. Inhibiteur de la monoamine-oxydase cérébrale avec des lésions irréversibles .

Les **alcools supérieurs** (propylique, butylique, amylique) ont un pouvoir bactéricide qui augmente avec leur masse molaire, mais leur solubilité dans l'eau diminue parallèlement, ce qui limite leur usage. L'efficacité des alcools est augmentée par association avec du formol (10% final) ou avec de l'hypochlorite de sodium (2000 ppm).

Les **alcools** (éthanol et propanol) sont efficaces à des concentrations voisines de 70 %. Ils ne sont pas efficaces contre les spores fongiques et sont rapidement inactivés par les protéines.

V.1.2.4. Les phénols.

Il s'agit d'un groupe d'antimicrobiens pour la plupart "odorants" dotés de propriétés microbicides dont les utilisations à des fins antiseptiques et désinfectantes dans le passé étaient nombreuses. Il s'agit de produits solides, la solubilité dans l'eau des diphénols étant plus élevée que celle du phénol.

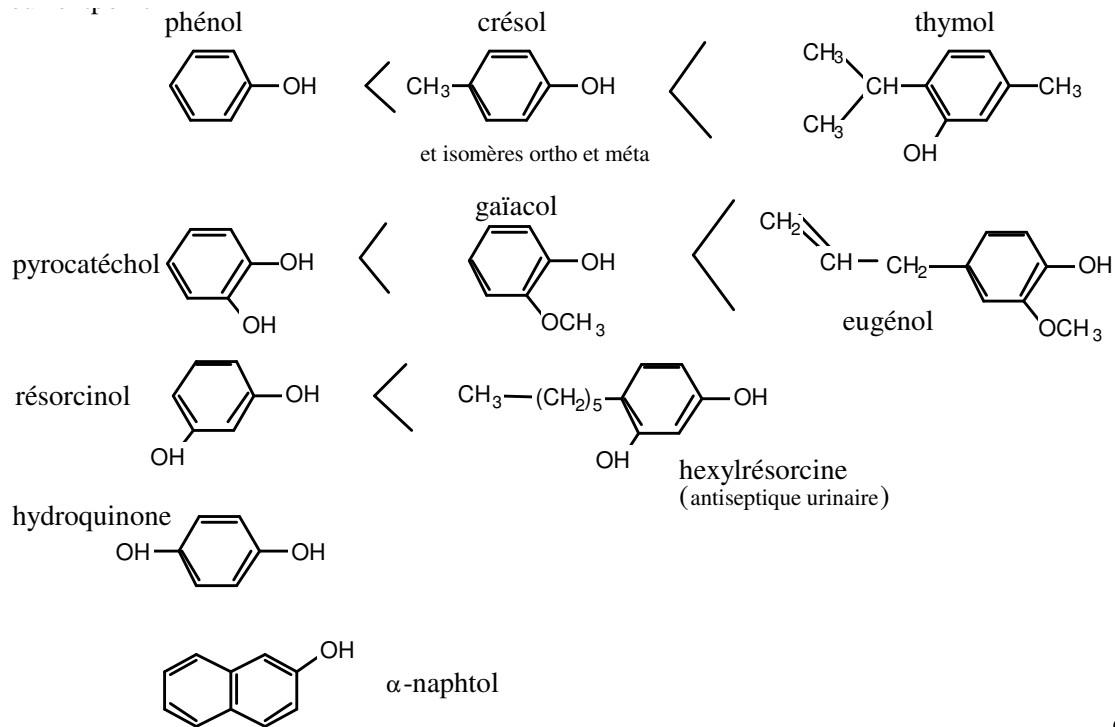
Le mécanisme d'action principal est lié à l'hydrophobicité de leur noyau "phénol". Dans le schéma qui suit les effets antimicrobiens sont classés en fonction de la structure chimique de ce noyau .

Ainsi l'effet antimicrobien du phénol est moins important que celui du thymol qui possède un "groupe" plus hydrophobe. Parallèlement la solubilité diminue avec cette hydrophobicité.

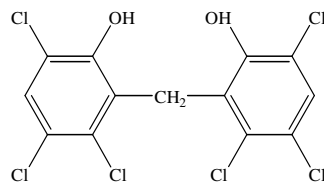
Certains de ces composés présentent une toxicité importante et les composés polycycliques possèdent pour la plupart des effets mutagènes ou cancérogènes.

Bactéricide et fongicide, le phénol est peu actif sur les formes sporulées. Son action augmente en présence de sels de sodium ou de potassium . Son action diminue en présence de soude et de matières organiques.

Les solutions de **phénols** clairs sont utilisées à la concentration de 1 à 5 %, leur stabilité est d'environ 1 semaine.



Il existe des dérivés complexes, comme l'hexachlorophène, dont l'effet antimicrobien est important.



V.1.2.5. Les savons et détergents (cf Cours de Technologie alimentaire)

a) Les savons.

Il s'agit le plus souvent de sels de sodium ou de potassium d'acides gras de masse molaire élevée. Comme dans le cas des alcools ou des phénols, il s'agit de molécules bipolaires avec une zone hydrophobe et une zone hydrophile mais qui, dans ce cas, est représentée par un groupement polaire ionisé (+ ou -) alors que la zone polaire des alcools ou phénols n'est pas (ou moins) ionisable. Cette propriété amphiphile est à l'origine de la diminution de la tension interfaciale qu'ils génèrent en se positionnant au niveau d'interfaces de liquides non miscibles.

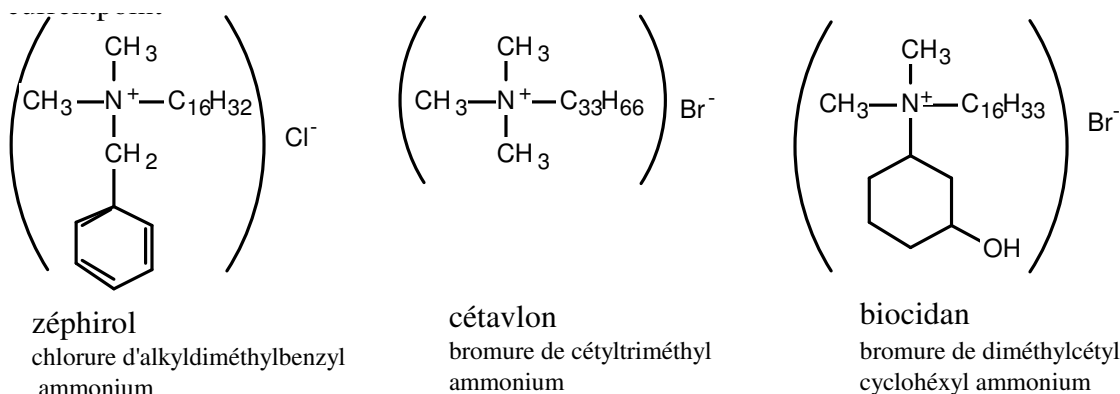
Leur pouvoir antiseptique varie en fonction des espèces microbiennes. Leur action est essentiellement mécanique. Ils abaissent la tension superficielle et augmentent le pouvoir mouillant de l'eau. Les germes sont éliminés par rinçage; Le **ricinolâte de sodium** est un des rares savons à posséder des propriétés antiseptiques (il s'agit d'un composé à chaîne aliphatique relativement hydrophobe en C20:4).

b) Les détergents.

- détergents anioniques comme le laurylsulfate de sodium ou SDS : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$ ou le teepol ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$).
- détergents cationiques. Il s'agit essentiellement d'ammoniums quaternaires.

Il existe des tensioactifs (émulsifiants) comme des “sucroglycérides” sans effet antimicrobien .

L’activité antimicrobienne des détergents anioniques est généralement faible. Certains de ces tensioactifs sont associés à des dérivés de métaux (mercryl-laurylé) et les antiseptiques obtenus sont très efficaces.



Les détergents à effet antimicrobien le plus net sont les dérivés des ammoniums quaternaires. Leur pouvoir mouillant et émulsifiant est élevé. Ils sont bactériostatiques à faibles concentrations (1 pour 10000 ou 1 pour 1000 000). Ils sont stables, incolores le plus souvent et à odeur agréable. Comme pour les autres tensioactifs, leur pouvoir moussant est fonction du niveau de “branchements” de la chaîne hydrophobe. Leur toxicité leur interdit toute utilisation en médecine interne. Ils sont utilisés comme désinfectants et antiseptiques cutanés .

Les **ammoniums quaternaires** sont généralement employés à des concentrations de l’ordre de 10 ‰ à 1 ‰. Leur double action (microbicide et détergente) et leur odeur agréable les fait utiliser largement. Non biodégradables pour la plupart, ils empêchent souvent les microorganismes de participer à l’auto-épuration

V.1.2.6. Les agents alkylants

Cf V.1.3.1. Formol et glutaraldéhyde

V.1.2.7. Les colorants.

Il s’agit de substances à pouvoir antiseptique très variable. Ils ne sont utilisés que pour des usages locaux et permettent en microbiologie analytique de fabriquer des milieux de culture sélectifs.

| <u>FAMILLE</u> | <u>COLORANT</u> | <u>UTILISATION</u> |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Thiazines Triphénylméthane | Bleu de méthylène | Antiseptique faible |
| | Vert malachite | Désinfection des plaies |
| | Vert brillant | |
| | Violet de méthyle | Antiseptique urinaire |
| Acridine | Violet de gentiane | |
| | Trypaflavine | Désinfectants locaux |
| | Gonacrine | |

Certains colorants possèdent une action sélective sur les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif : le cristal violet, le vert brillant, le vert malachite inhibent les bactéries à Gram positif ; l’éthyl-violet inhibe les *Bacillus* ; les dérivés de l’acridine inhibent les bactéries à Gram positif.

Cette propriété est essentiellement utilisée pour concevoir des milieux d’isolement ou de culture sélectifs.

Le tableau ci-après **résume** l’activité et les potentialités d’emploi de quelques agents désinfectants.

| | ACTIVITE CONTRE | | | | | INACTIVE PAR | | | | TOXICITE | | |
|---------------------|---------------------------|------------------|------------------|---------------|---------------------|--------------|-----------|----------|------------|----------|------|---------|
| | levures et moisissures | bactéries gram - | bactéries gram + | mycobactéries | spores bactériennes | protéines | matériaux | eau dure | détergents | peau | yeux | poumons |
| phénols | +++ | +++ | +++ | ++ | - | + | ++ | + | C | + | + | - |
| hypochlorites | + | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | + | + | C | + | + | + |
| alcools | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + | + | - | + | + |
| formaldéhyde | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + | + | - | + | + | ++ |
| glutaraldéhyde | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | + | + | - | + | + | + |
| iodophores | +++ | +++ | +++ | ++ | + | +++ | + | + | A | + | + | - |
| ammoniums 4aires | + | +++ | ++ | - | - | +++ | +++ | +++ | A,C | + | + | - |

A = détergent anionique , C = détergent cationique

V.1.2.8. Les conservateurs alimentaires

(cf cours de technologie alimentaire).

Le choix d'un additif alimentaire antimicrobien est souvent difficile. Un bon conservateur doit répondre aux critères suivants :

- il doit être microbicide plutôt que microbiostatique. Il doit être bactéricide et fongicide plutôt que bactériostatique ou fongistatique.
- il doit être actif sur les germes pathogènes et sur ceux responsables d'altérations.
- il doit être stable.
- il doit être inoffensif à la consommation et ne pas diminuer la valeur nutritionnelle de l'aliment.
- il doit être **autorisé** et leur liste est publiée au Journal Officiel de la République Française (arrêté du 2 octobre 1997) ; toute demande d'emploi de nouvelles molécules « conservatrices » doit être soumise à l'AFSSA. Bien que l'efficacité de ces substances ne soit plus à démontrer, l'emploi des conservateurs autorisés est régi par une législation stricte.

Le tableau ci-après présente quelques molécules potentiellement utilisables comme conservateurs sous réserve de leur autorisation par les autorités compétentes.

| Conservateurs | Tolérance | Microorganismes sensibles | Exemple d'aliment |
|-----------------------|-----------|---------------------------|-------------------------|
| Acide benzoïque* | 0,1% | Levures et moisissures | Margarine, cidre etc... |
| Acide caprylique | | Moisissures | Emballage des fromages |
| Acide déhydroacétique | 65 ppm | Insectes | Fraises |
| Acide propionique* | 0,32% | Moisissures | Pain, gâteaux, fromages |
| Acide sorbique* | 0,2% | Moisissures | Gelées, gâteaux. |
| Anhydride sulfureux** | 200 ppm | Insectes, microorganismes | Fruits secs, vin. |
| Antibiotiques | 10 ppm | Bactéries | Viandes, volailles. |
| Chlorure de sodium | Sans | Microorganismes | Viandes. |

| | | | |
|--------------------------------|---------|---------------------|-----------------------|
| Diacétate de sodium | 0,32% | Moisissures | Pain. |
| Diéthylpyrocarbonate | 200 ppm | Levures | Vin. |
| Ethylformate | 100 ppm | Champignons | Fruits secs. |
| Nitrite de sodium | 200 ppm | Bactéries sporulées | Poissons, viandes. |
| Fumée de bois | Sans | Microorganismes | Poissons, viandes. |
| Oxydes (éthylène et propylène) | 700 ppm | Champignons, vers | Epices. |
| Peroxyde d'hydrogène | | Microorganismes | Lait. |
| Saccharose | Sans | Microorganismes | Gelées, confitures... |

* et sels correspondants

** anhydride sulfureux , sulfites , bisulfites , métabisulfites

Un des modes de classification des conservateurs alimentaires repose sur les **modifications** (ou non) des qualités organoleptiques qu'ils engendrent.

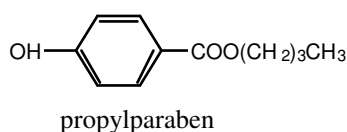
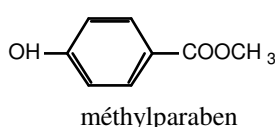
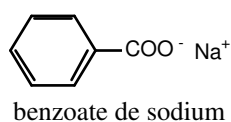
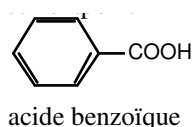
Ainsi, l'addition de chlorure de sodium, de saccharose, aboutissant à la réalisation d'aliments hypersalés (saumures etc...) ou hypersucrés (bonbons, confitures etc...), ne permettra, dans certaines conditions, que le développement des microorganismes respectivement halophiles ou osmiphiles.

Le fumage, l'addition de vinaigre, d'alcool ou de certains acides organiques sont des moyens chimiques de conservation qui sont susceptibles de modifier les qualités organoleptiques des aliments.

Comme moyen de conservation **ne modifiant pas** les qualités organoleptiques des aliments, on peut signaler les substances qui forment un écran entre le produit et le milieu ambiant. Les silicates alcalins sont ainsi utilisés pour conserver les oeufs, des fruits et des légumes. Le diphényle, l'orthophénylphénol sont réservés à la protection des fruits et légumes.

Un certain nombre d'antiseptiques chimiques ou d'antibiotiques peuvent être ajoutés aux aliments pour entraver ou supprimer la multiplication de microorganismes spécifiquement responsables d'altérations ou potentiellement dangereux.

a) Acide benzoïque et benzoates



L'activité antimicrobienne (antifongique surtout) de ces dérivés est meilleure à pH relativement bas (produits végétaux acides), les formes protonées obtenues en dessous du pK_a possédant d'excellents effets antimicrobiens.

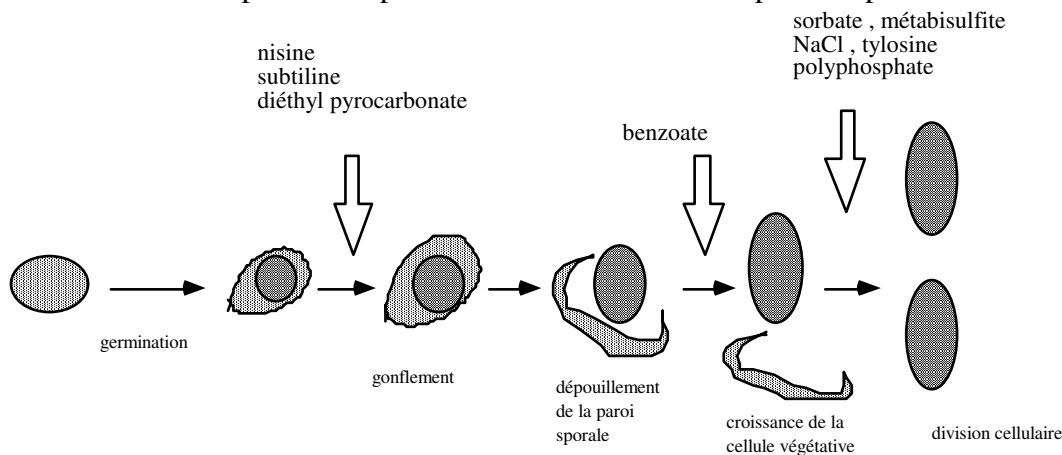
b) Acide propionique et propionates. Il s'agit d'inhibiteurs de croissance des moisissures. Ils sont actifs à des pH faibles.

c) Acide sorbique et sorbates. Ces composés sont surtout actifs pour des pH faibles.



d) L'anhydride sulfureux (SO_2), les sulfites ($= \text{SO}_3$), les bisulfites ($= \text{HSO}_3$), et les métabisulfites ($= \text{S}_2\text{O}_5$). Ces composés sont utilisés sous forme liquide ou gazeuse, ou sous la forme d'un de leurs sels pour les jus de fruits, les vins, les mélasses. L'anhydride sulfureux possède une activité antimicrobienne et, dans certains aliments, des propriétés anti-oxydantes. Les bactéries lactiques, de nombreuses moisissures sont plus sensibles à l'anhydride sulfureux que les espèces à métabolisme fermentatif.

e) Les **antibiotiques**. Parmi les antibiotiques utilisés comme conservateurs alimentaires, on peut signaler : la nisine, la subtiline, la tylosine, la pimarycine, certaines tétracyclines et la polymyxine. Ceux qui sont efficaces sur les spores sont particulièrement intéressants pour les produits non stérilisables .

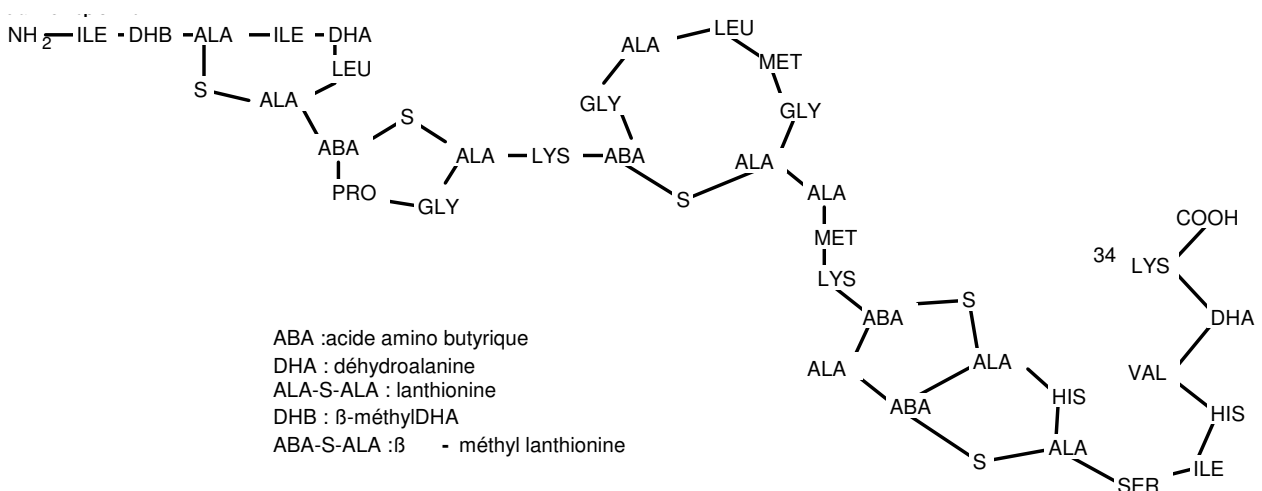


- la **nisine** (polypeptide) est active sur les bactéries à Gram positif et sur les spores. Soluble à pH 2, elle précipite à pH 7; elle est stable à la chaleur en milieu acide. Elle provoque la lyse de la membrane cytoplasmique. Produite par *Streptococcus lactis*, elle est utilisée dans la fabrication de certains fromages et en conserverie à des doses voisines de 500 à 5000 UI / g.

- la **subtiline** (polypeptide) est stable de pH 2,5 à 7. Elle est active sur les bactéries à Gram positif et sur quelques bactéries à Gram négatif. Son activité sporostatique la fait utiliser dans l'industrie des conserves. Elle est produite par *Bacillus subtilis*.

- la **tylosine** (C₄₅H₇₇O₁₇N) est active sur les bactéries à Gram positif sur quelques bactéries à Gram négatif et sur les bacilles alcool-acido-résistants. Son pouvoir sporicide permet son utilisation en conserverie. Elle est produite par *Streptomyces fradiae*.

La structure de la nisine est la suivante :



f) La fumée de bois.

Parmi les nombreux composants de la fumée de bois à activité antimicrobienne, on peut citer : le formol, des acides organiques, des alcools, des cétones, des phénols, des crésols ...

V.1.2.9. Antiseptiques de la famille des biguanidines (chlorhexidine), des salicylanilides ou des carbanilides

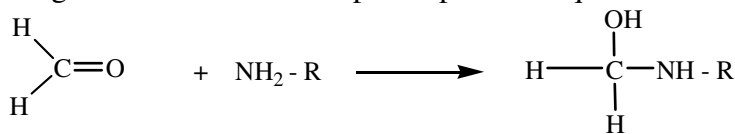
V.1.3. Stérilisation par les gaz.

Il s'agit de procédés élégants et pratiques utilisés pour des produits instables à la chaleur et pour la désinfection de locaux ou d'objets.

V.1.3.1. Le formol.

Les vapeurs formées par chauffage d'une solution diluée de formol ou de ses produits de polymérisation sont bactéricides. Le pouvoir bactéricide augmente avec la température et l'humidité. Ainsi, il est possible de "stériliser" en quelques heures à partir de 22°C à HR = 80% (Le formaldéhyde est peu actif à des températures inférieures à 20°C et requiert une humidité relative minimale de 70%).

Les formes végétatives sont détruites plus rapidement que les formes sporulées.



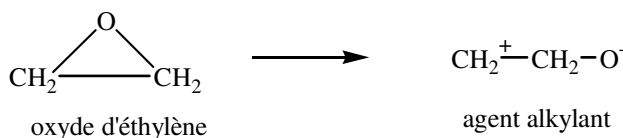
Pour la désinfection des locaux, de l'ammoniaque est ajoutée pour diminuer la toxicité ; dans ces conditions, le formol donne avec l'ammoniac un composé inodore : l'hexamine.

Le formol peut être généré par ébullition d'une solution de formaldéhyde à 40 %. Sa concentration désinfectante optimale est de 50 mg.m⁻³ (Pour un volume de 1 m³ on porte à 75 ml de formol à 40 %. Le formol peut aussi être généré à partir du chauffage à sec de paraformaldéhyde (10 g par m³) ou par addition de 20 g de permanganate de potassium à 75 ml de formol à 40 % à température ambiante (pour 1 m³).

Il est également possible de générer la quantité de formol nécessaire à la stérilisation de la hotte par mélange de 4 g de paraformaldéhyde, 8 g de permanganate de potassium et 10 ml d'eau.

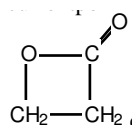
La durée de ce type de traitement doit être d'une dizaine d'heures et le système de ventilation mis en marche au moins une demi-heure avant réutilisation.

V.1.3.2. L'oxyde d'éthylène.



Ce composé est gazeux à température ordinaire et liquide au dessous de 10°C . Il n'est pas utilisable pur en raison de son inflammabilité. Mélangé avec de l'anhydride carbonique ou du fréon, il constitue un antiseptique puissant , bactéricide et sporicide. Il est parfois toléré dans la stabilisation microbienne des épices .

V.1.3.3. La β propionolactone.



Ce composé, liquide à température ordinaire émet des vapeurs bactéricides, sporicides, virulicides et fongicides. Toutes conditions étant égales par ailleurs, il est 25 fois plus actif que le formol et 4000 fois plus que l'oxyde d'éthylène. Ininflammable, il est assez pénétrant. En solution aqueuse, il est hydrolysé

en acide β hydroxy-propionique inactif. Il est utilisé pour stériliser des objets, des milieux de culture, etc...

V.1.3.4. *Le SO₂* (cf V.1.2.7.b)

Ce gaz induit au niveau des protéines (microbiennes) des réactions d'addition et des réactions de sulfitylolyse avec formation de dérivés S-sulfonés relativement instables. Ce sont les ponts disulfure des protéines qui subissent le plus souvent cette sulfitylolyse.

V.1.3.5. *Les essences volatiles.*

Les essences naturelles ont un pouvoir bactéricide lié à la présence de composés phénoliques, d'alcools, d'aldéhydes, etc...

- essence d'eucalyptus : antiseptique des voies respiratoires.
- essence de girofle : désinfectant en chirurgie dentaire.
- essence de thym : antiseptique intestinal et respiratoire.

Ces essences sont remplacées par leur composé actif : eucalyptol, thymol, eugénol utilisés d'ailleurs parfois comme conservateurs alimentaires.

V.1.3.6. *Ozone*

Ce gaz (O₃) est très efficace dans la stérilisation de l'eau. Il est par ailleurs décolorant et désodorisant

V.1.3.7. *L'anhydride carbonique sous pression*

Des travaux récents réalisés au laboratoire montrent qu'à des pressions de l'ordre de 6 bars ou plus ce gaz présente des effets microbicides particulièrement intéressants .

V.1.4. *Mesure de l'activité microbicide.*

Le but de cette mesure est de tester l'activité d'une substance par rapport à une ou des substances de référence (coefficient phénol), et de rechercher son activité après désinfection d'un objet, d'une surface etc...

V.1.4.1. *Mesure du coefficient phénol*

Il s'agit de comparer l'activité d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test (*Salmonella typhi* pour les désinfectants, *Staphylococcus aureus* pour les antiseptiques).

Pour cela, on réalise des dilutions croissantes du produit à tester à raison de 5 ml par tube. On ajoute 5 gouttes d'une culture de 24 heures de *Salmonella typhi*. On prélève dans chacun des tubes aux temps 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 12,5 et 15 minutes 10 μ l (ou 1 öse) qui sont inoculés dans un bouillon nutritif.

La même opération est réalisée avec des dilutions de phénol. Après 48 heures d'incubation à 37°C, on note la dilution la plus élevée du désinfectant et celle du phénol qui tuent les germes en 7,5 minutes et non en 5 minutes. Le coefficient phénol est alors égal au rapport entre la dilution du phénol et celle du désinfectant.

$$\text{Coef phénol} = \frac{[\text{phénol}]}{[\text{désinfectant}]}$$

De nombreuses critiques peuvent être faites quant aux résultats fournis par cette méthode. En effet, le phénol n'est pas actif de façon homogène sur tous les microorganismes, et il peut en être de même pour la substance testée.

Dans les conditions opératoires décrites, *S. typhi* est tuée en 10 minutes par le phénol dilué au 1/90, mais résiste 5 minutes. *S. aureus* survit 5 minutes dans du phénol dilué au 1/60.

V.1.4.2. Méthode des portes germes.

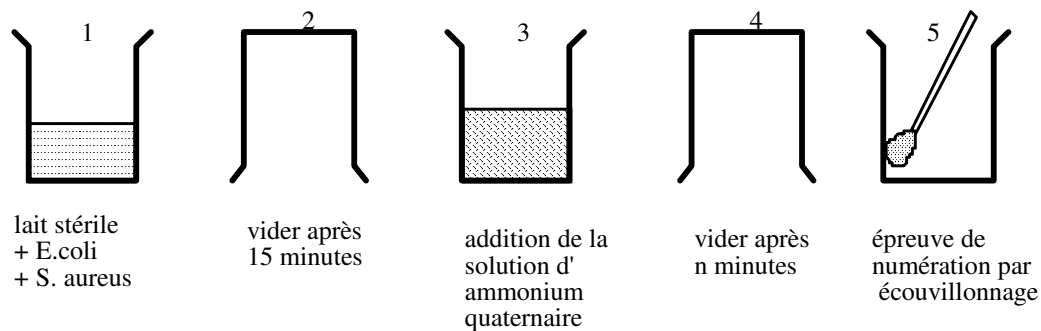
Le porte germe est constitué d'une bandelette de papier filtre. Cette dernière est immergée dans une culture de 24 heures en bouillon d'un germe test. Séché (24 h à 37°C) ou tel quel, le papier est mis au contact du désinfectant pendant des temps variables et déterminés. La survie ou la destruction des germes est mise en évidence par immersion du papier préalablement séché dans un bouillon nutritif suivie d'une mise en incubation de 24 heures au moins à l'étuve.

V.1.4.3. Méthode de dénombrement.

En industrie alimentaire, au niveau des équipements (chaînes, tables, matériels divers...), la présence de bactéries pathogènes peut entraîner la contamination continue du produit préparé. La propreté est obtenue par élimination physique (brossage- écouvillonnage), des agents chimiques (détergents et désinfectants). Généralement, le désinfectant n'est actif que sur des surfaces détergées (les matières organiques inhibant son action). Ces opérations sont suivies d'un rinçage à l'eau "pure" chlorée.

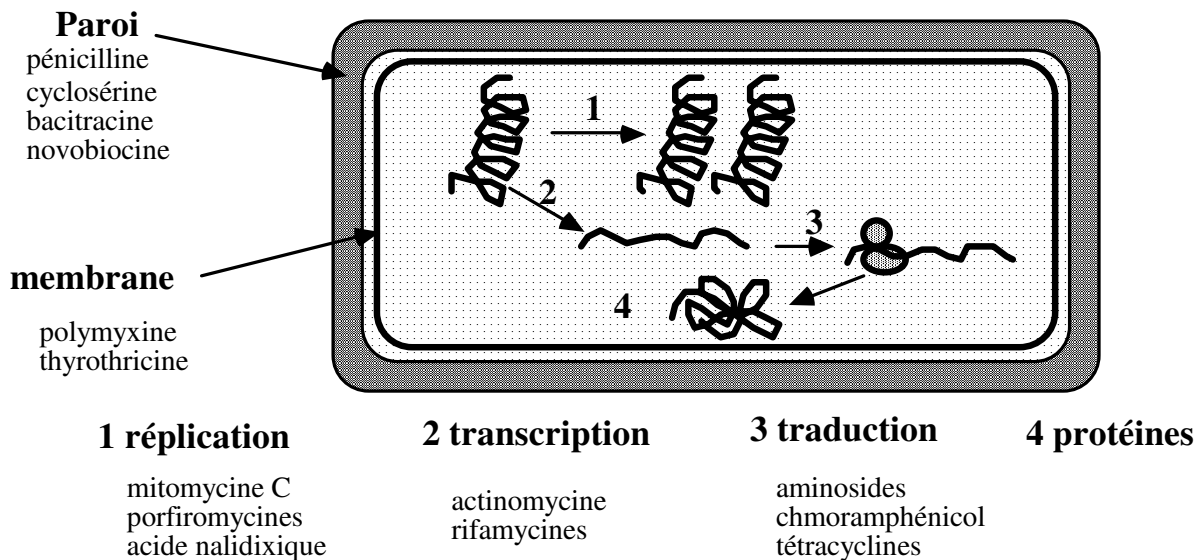
Le dénombrement des germes peut être réalisée par :

- la méthode des empreintes : un ruban de "scotch" est appliqué sur la surface à tester, puis sur un milieu gélosé. La durée des contacts doit se situer aux environs de 10 secondes. Cette méthode est utilisable pour *Salmonella* et les *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* du groupe D.
- la méthode de l'écouvillonnage : elle repose sur l'utilisation d'écouvillons en coton hydrophile ou d'alginate de calcium. Les zones à explorer sont d'abord mouillées, ce qui permet une récupération d'environ 50% des microorganismes.
- l'épreuve de rinçage (mise en évidence de l'action des ammoniums quaternaires sur des surfaces contaminées).



V.2. Quelques notions sur les agents chimiothérapeutiques

Chaque antibiotique exerce son action biochimique en modifiant une réaction particulière du métabolisme bactérien. Le parallélisme entre leur action au laboratoire sur différentes espèces microbiennes et leur efficacité chimique dans les infections causées par ces espèces a été mis en évidence. In vivo, l'effet antibactérien ne peut s'exercer que si certaines conditions de concentration et de contact sont réalisées et dans chaque infection, il existe un mécanisme d'action antibiotique. Il est donc indispensable de connaître tous ces éléments pour choisir les épreuves de laboratoire susceptibles de donner les renseignements les plus utilisables.



Les antibiotiques sont des substances sécrétées par un organisme vivant s'opposant à la vie des autres organismes (bactéries et champignons). Les antibiotiques ne sont toxiques que pour les bactéries (à certaines concentrations), mais il se peut qu'un antibiotique donné ne soit toxique que pour une espèce définie.

Les antibiotiques peuvent être d'origine fongique (*Penicillium notatum* et la pénicilline) ou bactérienne (subtiline). Ils sont utilisés à l'état naturel ou sous forme de dérivés chimiques parfois plus actifs.

V.2.1. Quelques informations sur le mode d'action biochimique des antibiotiques.

Chaque antibiotique inhibe ou modifie une réaction particulière et très précise du métabolisme bactérien. Sans entrer dans le détail des mécanismes biochimiques impliqués dans ces réactions, il est possible de distinguer :

V.2.1.1. Inhibition de la synthèse d'un constituant de la cellule.

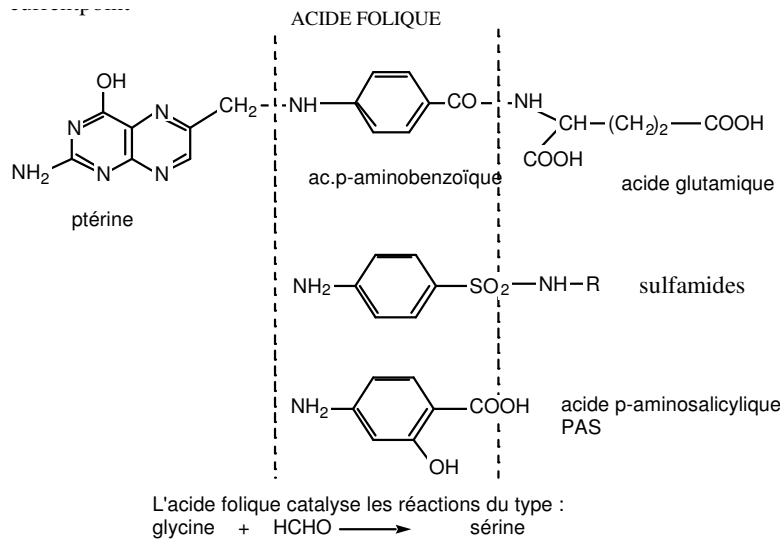
Sur un constituant de la paroi : les bactéries en croissance se lysent en présence de pénicilline dans un milieu incapable de les protéger contre les variations de pression osmotique. En milieu hypertonique, il se forme des protoplastes (G+) et des sphéropastes (G-) . La pénicilline présente des analogies de structure avec l'acide diaminopimélique (DAP).

V.2.1.2. Action sur la membrane cytoplasmique.

Thyrothricine, polymyxine, colistine détruisent la membrane comme des détergents cationiques.

V.2.1.3. Analogie stérique avec des métabolites.

Ce mode d'action intervient peu dans le cas des antibiotiques fongiques ou microbiens ; un des mieux connus est celui des sulfamides. Les sulfamides sont des analogues stériques d'un coenzyme vitaminique : l'acide paramino-benzoïque. Ils empêchent son utilisation pour la synthèse de l'acide folique, catalyseur de réactions du type :



En présence de sulfamides, les bactéries s'appauvrissent rapidement en acide folique et cessent de fabriquer certains acides aminés. Il y a arrêt de la croissance sans destruction immédiate de la bactérie, ce qui fait dire que les sulfamides sont bactériostatiques (il se produit une altération des phases de croissance conduisant à un nombre de bactéries inférieur à celui de la croissance totale sans antibiotique, mais supérieur au nombre de bactéries existantes au moment où on les a mises en présence de l'antibiotique).

V.2.1.4. Action sur les protéines plasmatiques

Le chloramphénicol empêche la synthèse des protéines plasmatiques. Il présente des analogies de structure avec les acides aminés aromatiques. Cette inhibition de la synthèse des protéines plasmatiques par le chloramphénicol protège complètement les bactéries de l'effet lytique de la pénicilline. Il y a là un exemple de mécanisme biochimique d'un antagonisme entre deux antibiotiques. Il faut noter que l'activité est liée à des formes stéréochimiques bien précises : seul le chloramphénicol D- thréo est actif.

V.2.1.5. Inhibition de systèmes enzymatiques importants de la production d'énergie.

Streptomycine, néomycine, kanamycine, framycétine entraînent la disparition de certains cytochromes et diminuent l'intensité respiratoire des bactéries. Ces antibiotiques se fixent sur les constituants cytoplasmiques électronégatifs. Un pH élevé et une forte concentration ionique diminuant la formation des complexes diminuent l'activité de ces antibiotiques.

Les tétracyclines inhibent les transferts d'hydrogène; la gramicidine inhibe la synthèse de l' ATP.

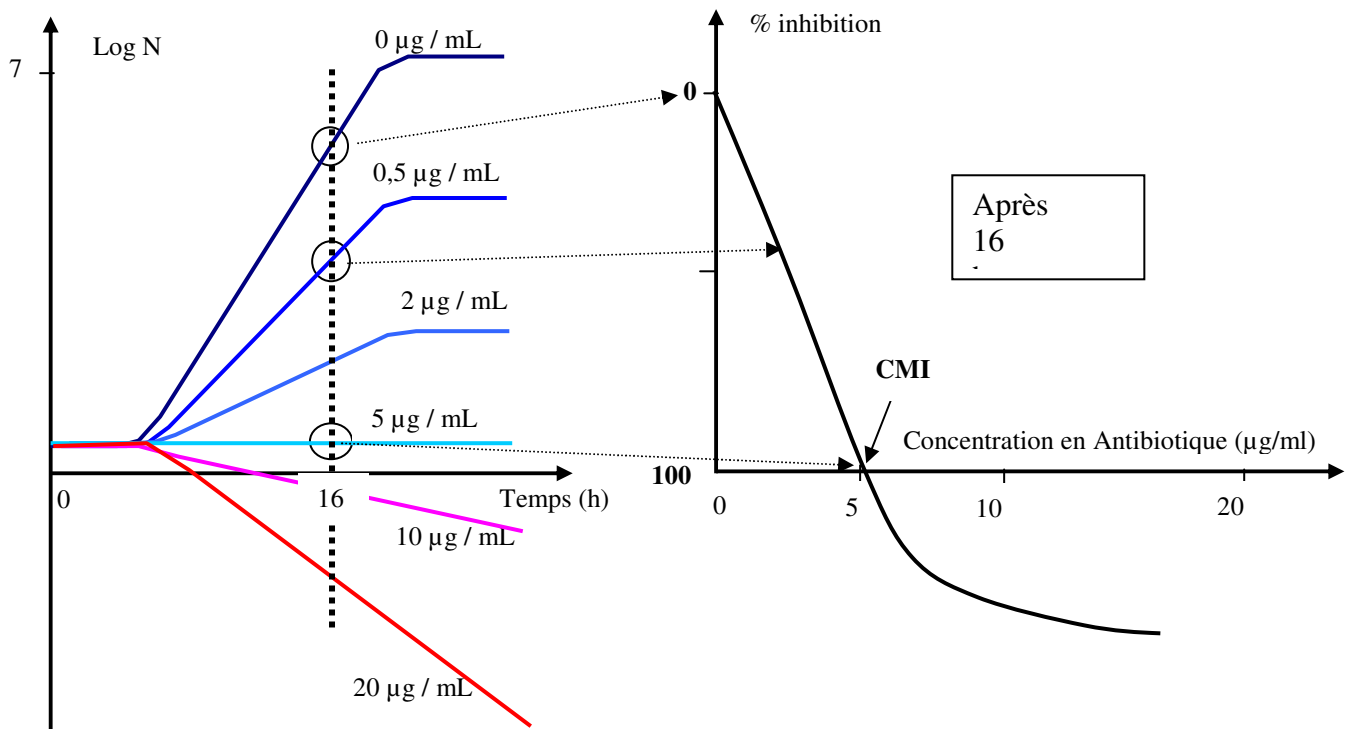
Par opposition, sont dits bactéricides les antibiotiques comme la pénicilline dont l'action, empêchant la formation de la paroi de nouvelles bactéries, est létale pour cette bactérie dans un milieu à pression osmotique normale.

On cherche donc des analogues stériques d'acides aminés, qui font perdre aux protéines formées leurs éventuelles activités enzymatiques, et des analogues de bases puriques ou pyrimidiques qui peuvent inhiber la synthèse des protéines par brouillage du code génétique. La plupart des antibiotiques actuels ont été découverts empiriquement par sélection de microorganismes dotés d'activités "antagonistes".

V.2.2. Modalités de l'action antimicrobienne.

La construction des courbes de croissance in vitro en présence de concentration croissante en antibiotiques permettent de définir des points limites : la concentration minima inhibitrice (**CMI**) qui correspond à la concentration en antibiotiques pour laquelle on n'observe pas de croissance visible ; la

concentration inhibitrice 50% (la croissance n'est égale qu'à la moitié de la croissance du témoin) ; la concentration minima bactéricide (CMB).



Un germe est dit **résistant** quand la concentration d'antibiotique qu'il est capable de supporter est supérieure à la concentration qu'il est possible d'atteindre in vivo (cette concentration est inférieure à la CMI).

Un germe est dit **sensible** quand sa croissance est inhibée par des concentrations en antibiotiques que l'on peut atteindre in vivo (ces concentrations sont supérieures à la CMI). On dit que la sensibilité est **limite** si le taux sanguin est très peu inférieur à la CMI.

La sensibilité bactérienne est déterminée en réalisant un antibiogramme in vitro.

V.2.3. Détermination de la sensibilité bactérienne in vitro aux antibiotiques.

Elle repose sur 2 grands groupes de techniques :

V.2.3.1. Méthode de dilution en milieu liquide.

Elle consiste à effectuer des dilutions successives d'antibiotiques dans un milieu liquide approprié ensemencé avec le germe à étudier et à noter pour quelle concentration en antibiotique la croissance est totalement inhibée. On détermine alors la concentration bactérienne.

| | | | | |
|-------------------|--------------------|---------|---|--------|
| Milieu de culture | peptone tryptique | 10 | g | pH 7,3 |
| | extrait de levure | 0,5 | g | |
| | chlorure de sodium | 5 | g | |
| | glucose | 10 | g | |
| | rouge de phénol | 0,02 | g | |
| | eau D | 1000 ml | | |

Le milieu est ensemencé avec une goutte de culture de 24 heures de la souche à étudier (culture T). Les solutions d'antibiotiques sont préparées à 2 concentrations : solution A à 100 µg/ml et solution B égale au 1/16 de la solution A.

Dans une série de 9 tubes, on réalise des dilutions croissantes en antibiotiques.

| tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| eau stérile | 0 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | |
| solution A | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | | | | | | |
| solution B | | | | | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | | |
| culture test | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | |
| Ab µg/ml | 50 | 25 | 12 | 6 | 3 | 1,5 | 0,8 | 0,4 | 0 | |

Les tubes sont alors placés à 37°C pendant 24 heures (ou 18 heures). La culture est appréciée par le demi virage de l'indicateur (rose) ou par un virage franc (jaune). La souche est dite sensible à une concentration déterminée lorsque celle-ci inhibe la croissance, ce qui correspond à la teinte rouge de l'indicateur. Il est important que la bactérie soit glucose + pour acidifier le milieu.

V.2.3.2. Méthode de diffusion en milieu solide.

Elle est mieux adaptée que la précédente aux techniques de laboratoire essentiellement en raison de sa plus grande facilité de réalisation.

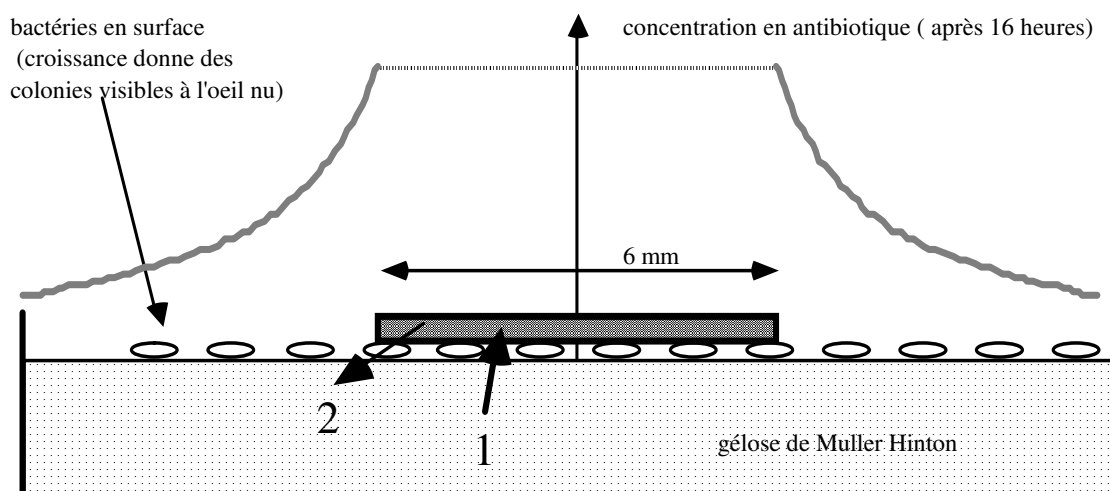
a) Principe.

Des disques imprégnés de l'antibiotique à tester sont déposés sur la surface d'une gélose spéciale préalablementensemencée du germe dont on veut étudier la sensibilité.

Plusieurs phénomènes entrent alors en jeu :

- le **transfert d'eau** du milieu vers le disque
- la **solubilisation** de l'antibiotique
- la **diffusion** de l'antibiotique régie par la loi de Fick et qui dépend surtout de la nature de l'antibiotique, de sa concentration initiale (charge du disque), de sa solubilisation au contact de la gélose. La température importante dans ce phénomène est généralement fixée à 30-37°C. Il s'agit d'un phénomène cinétique.
- la **croissance** microbienne .

Un état d'équilibre s'installe au bout de 15 à 48 heures et c'est cet état qui est analysé .



- 1 diffusion de l'eau vers le disque et solubilisation de l'antibiotique
2 diffusion de l'antibiotique dans la gélose

En général, la quantité d'antibiotique des disques est calculée de telle façon que la concentration en antibiotique correspondant au taux sanguin qu'il est possible d'atteindre dans l'organisme humain, soit répartie sur un cercle de 15 mm de diamètre (10 mm pour la colimycine et la polymyxine). Il s'agit donc de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque imprégné d'un antibiotique déterminé, déposé à la surface d'un milieu de culture gélosé ensemencé de la bactérie à étudier.

| | | | |
|----------------------|--------------------|---------|----------|
| b) Milieu de culture | peptone tryptique | 20 g | |
| (Muller Hinton) | extrait de levures | 3 g | |
| | chlorure de sodium | 5 g | |
| | gélose | 25 g | |
| | eau D | 1000 ml | pH = 7,2 |

Le milieu réparti en flacon de 25 ml est régénéré au bain-marie bouillant. Après refroidissement (50°C) ce milieu est coulé en boîte de Pétri stérilement. Après solidification la boîte est séchée à l'étuve.

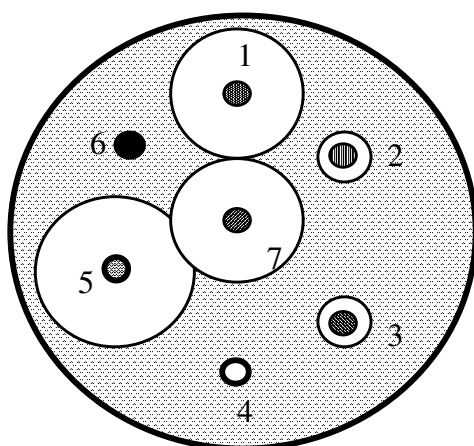
c) Ensemencement. Il doit être homogène sur la surface de la gélose. Pour cela, diluer 1 goutte de culture de 24 heures dans 10 ml d'eau stérile (ou 1 öse de culture sur milieu solide dans 10 ml d'eau stérile). Déposer 1 goutte de la suspension sur la surface du milieu et étaler le plus régulièrement possible en nappe au moyen d'une pipette coudée (les colonies apparaissant à la surface ne doivent pas être confluentes ; un développement trop dense entraîne une diminution de la zone d'inhibition).

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface du milieu au moyen d'une pince flambée entre chaque opération et de façon aseptique. La boîte est alors incubée, couvercle en bas, pendant 18 heures à 37°C.

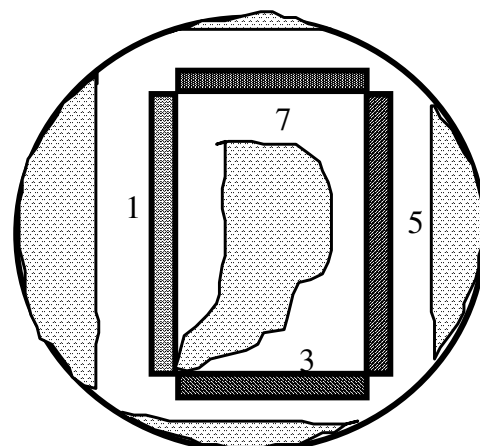
d) Lecture.

Elle est fonction de l'existence ou non de zones d'inhibition. Cette lecture est essentiellement qualitative. Trois réponses sont possibles :

- souche sensible : le diamètre de la zone d'inhibition est égal ou supérieur 15 mm (sauf pour polymyxine et colimycine 10 mm).
- souche limite : le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm.
- souche résistante : pas de zone d'inhibition.



- 1 , 4 , 6 résistance
5 et 7 germe sensible
2 et 3 germe limite



- 1 - 7 indifférence
1 - 3 antagonisme
7 - 5 addition
5 - 3 synergie

e) Etude de l'association d'antibiotiques

L'association d'antibiotiques (2 en général) peut produire une synergie des effets bactériostatiques ou bactéricides, ou l'addition des effets des 2 antibiotiques pris séparément, ou au contraire un antagonisme (les 2 antibiotiques voient leurs effets annulés du fait de leur association). Pour étudier ces effets, on utilise des bandes papier buvard imprégnées d'antibiotiques dont on veut étudier les effets d'association, disposées perpendiculairement dans une boîte de Pétri. Les antibiotiques diffusent à partir de chaque bande dans la gélose. Dans les zones de contact de 2 bandes, les deux antibiotiques sont présents et la forme de la zone d'inhibition permet la lecture de l'effet associatif.

Les antibiotiques dont on détermine l'activité par ces méthodes sont souvent choisis en fonction de l'activité (ou non) qu'ils manifestent ou qu'ils sont susceptibles de manifester a priori (ceci est lié aux nombreuses mesures réalisées jusqu'à ce jour).

Il est possible de déterminer la CMI par la méthode de diffusion au moyen de la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en utilisant les droites représentant le diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la CMI. Les graphes proposés par les fabricants (Pasteur – Mérieux par exemple) de milieux et disques permettent de déterminer rapidement la

V-2.4. Les sulfamides et les nitrofuranes

L'activité est liée au groupement $\text{SO}_2\text{-NH-R}$ en position para. Les variations de R permettent de décrire plus de 5 000 substances. Il s'agit d'agents bactériostatiques (inhibition compétitive) peu solubles dans l'eau. La posologie est de 2 à 8 g par jour. Ils sont toxiques à dose élevée. Ils sont surtout actifs sur les cocci (Pneumocoque, méningocoque, *Shigella*). Les nitrofuranes sont bactéricides in vitro.

V-2.5. Les agents antituberculeux (en association avec la streptomycine)

- L'acide p-amino salicylique (PAS), bactériostatique ; il s'agit d'un analogue stérique de l'acide p-aminobenzoïque.
- L'isoniazide (INH) est un composé très stable à chaud ; bactériostatique puis bactéricide. Il s'agit d'un analogue de la pyridoxine.

V-2.6. Les antibiotiques

Ils sont classés en fonction de leur appartenance à une famille organique bien définie.

a) Pénicillines (produites par *Penicillium notatum*, *P. chrysogenum*)

Il existe des pénicillines de synthèse et les germes sont classés en :

Ps : pénicillinase sensible

Pr : résistant à la pénicillinase.

L'ampicilline est la seule à posséder une activité sur les bacilles G-. Les pénicillines sont bactéricides (bactériostatiques à faibles concentrations). Elles sont actives sur les germes G+ et *Neisseria*. La résistance des germes à la pénicilline est liée à l'acquisition de pénicillinase. Posologie ~106 U/j (1 mg de pén G = 1 670 U). Des chocs anaphylactiques ne sont pas à exclure en raison de son pouvoir antigénique.

* Les pénicillines appartiennent à la famille des β -lactamines avec les céphalosporines.

b) Famille des oligosaccharides

- streptomycine (produite par *Streptomyces griseus*). Son activité augmente en milieu alcalin (elle est 1000 fois plus active à pH 8 qu'à pH 6).

Elle est bactéricide pour de nombreux germes G+ et G-. Quand une bactérie est résistante à l'un d'eux elle le devient pour les deux : résistance croisée. Ces substances sont toxiques pour les cellules nerveuses et pour les cellules rénales.

c) Famille des tétracyclines

Ces antibiotiques sont bactériostatiques et actifs sur les bactéries à Gram + et à Gram -. Elles présentent le phénomène de résistance croisée. Au niveau intestinal, son action aboutit à la sélection de germes résistants tels que *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Candida* etc...

d) Famille des macrolides

Il s'agit de molécules organiques complexes à cycle lactonique.

On peut citer comme antibiotique appartenant à cette famille : l'érythromycine, la spiramycine, la carbomycine et l'oléandomycine.

e) Famille des polypeptides

Les polymyxines (B, E), la bacitracine, la thyrothricine appartiennent à cette famille. La polymyxine B (produite par *Bacillus polymyxa*) est un cyclopeptide ramifié, toxique.

La polymyxine E (colimycine ou colistine) présente une structure voisine. Ces antibiotiques sont bactéricides sur les bactéries à Gram -.

La bacitracine (*Bacillus licheniformis*) est active sur les bactéries à Gram+. Sa toxicité rénale est élevée. La thyrothricine (*Bacillus brevis*) ou gramicidine est active sur les germes à Gram +. Elle est cependant toxique pour le rein et le système nerveux.

f) le chloramphénicol (*Streptomyces venezuelae*).

Cet antibiotique est relativement facile (par rapport à certains autres) à synthétiser.

Il est bactériostatique sur les bactéries à Gram + et à Gram -. Il est très efficace dans le traitement des fièvres typhoïdes. Son utilisation "intempestive" peut conduire à des accidents graves (leucopénies etc...).

g) Les ansamycines - rifampicine - novobiocine

SOMMAIRE

I - LES RELATIONS ALIMENTS-MICROORGANISMES-CONSUMMATEURS

| | | | |
|----|---|--|----|
| I | - | INTRODUCTION | 1 |
| I | - | 1 La Qualité marchande | 1 |
| I | - | 2 La Qualité hygiénique | 1 |
| II | - | ROLE ET SIGNIFICATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS | 2 |
| | | II-1 Sources primaires de microorganismes | 2 |
| | | II.1.1. Sol et eau | 2 |
| | | II.1.2. Plantes et produits dérivés | 3 |
| | | II.1.3. Animaux et produits dérivés | 3 |
| | | II.1.4. Air et poussière | 3 |
| | | II.1.5. Produits fermentés | 3 |
| | | II.1.6. Microorganismes aliments | 3 |
| | | II-2 Altérations microbiennes des aliments | 4 |
| | | II.2.1. Contamination naturelle | 3 |
| | | II.2.2. Incidences sur la qualité marchande | 4 |
| | | 1. Relations microorganismes/composition de l'aliment | 4 |
| | | 2. Modifications de l'odeur | 4 |
| | | 3. Modifications du goût | 5 |
| | | 4. Modifications de l'aspect et de la couleur | 6 |
| | | 5. Structure et texture | 6 |
| | | 6. Modification de la valeur alimentaire | 7 |
| | | II-3 Principaux paramètres de contrôle de la prolifération microbienne dans nos aliments | 7 |
| | | II.3.1. Caractères propres à l'aliment | 7 |
| | | II.3.1.1. Structures biologiques | 7 |
| | | II.3.1.2. Agents antimicrobiens naturellement présents | 7 |
| | | II.3.1.3. Composition chimique de l'aliment | 8 |
| | | II.3.1.4. pH | 8 |
| | | II.3.1.5. Activité de l'eau | 10 |
| | | II.3.1.6. Potentiel d'oxydo-réduction | 11 |
| | | II.3.2. Paramètres externes à l'aliment | 12 |
| | | II.3.2.1. Température d'entreposage | 12 |
| | | II.3.2.2. Humidité relative | 14 |
| | | II.3.2.3. Présence et concentration de gaz | 14 |
| | | II.3.2.4. Antimicrobiens produits au cours de la fabrication de l'aliment | 14 |
| | | II-4 La microbiologie prédictive | 15 |

II - MALADIES MICROBIENNES TRANSMISES PAR LES ALIMENTS

| | | |
|----------|---|----|
| I | Modes de contamination microbienne des aliments | 19 |
| II | Essai d'analyse épidémiologique | 19 |
| III | Principales maladies bactériennes transmises | 21 |
| III.1. | Toxi-infections à <i>Salmonella</i> | 21 |
| III.2. | Entérototoxicose staphylococcique | 24 |
| III.3. | Toxi-infections à <i>Clostridium perfringens</i> | 26 |
| III.4. | Intoxication botulinique | 27 |
| III.5. | Autres maladies liées à la consommation d'aliments | 29 |
| III.5.1. | <i>Bacillus cereus</i> | 29 |
| III.5.2. | <i>Vibrio cholerae</i> et <i>V. parahaemolyticus</i> | 29 |
| III.5.3. | <i>Listeria monocytogenes</i> | 30 |
| III.5.4. | <i>Escherichia coli</i> | 50 |
| III.5.5. | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 51 |
| III.5.6. | <i>Campylobacter jejuni</i> | 51 |
| III.5.7. | <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> | 51 |
| III.3.6. | Conclusion | 52 |

| | |
|---|----|
| Directive 93/43 de la CEE Hygiène des locaux, des denrées et des personnels | 54 |
| Sites internet | 57 |
| IV - Les mycotoxines | 59 |
| V - Principales maladies parasitaires transmises par les aliments | 63 |
| III.5.1. Protozoaires (unicellulaires) | 63 |
| III.5.2. Helminthes | 64 |
| III.5.3. Arthropodes | 64 |
| III.5.4. Poisons de coquillages et poissons | 64 |
| III.5.5. Mycoses | 64 |
| VI – Les virus en agro-alimentaire | 65 |
| Tableau : Maladies d'origine bactérienne | 68 |
| Tableau : Maladies à virus et rickettsies | 77 |
| Tableau : Entérotoxines | 79 |
| Tableau : relations aliments → maladies | 81 |

| | |
|--|----|
| VII - PREVENTION DES RISQUES MICROBIOLOGIQUES PAR LA MAITRISE DES POINTS CRITIQUES Méthode HACCP | 88 |
| IV - 1 Contrôle traditionnel, ses limites (inspection, analyse microbiologique) | 89 |
| IV - 2 Le système HACCP | 89 |
| IV.2.1. Historique. Notion de qualité microbiologique | 89 |
| IV.2.2. Le système HACCP en tant que démarche structuraliste et intégrée | 90 |
| IV - 3 Principales étapes | |
| IV.3.1. Etablissement d'un diagramme de fabrication détaillé | 91 |
| IV.3.2. Identification et évaluation des risques | 91 |
| IV.3.3. Identification des points critiques et de contrôle | 92 |
| IV.3.4. Choix des options de maîtrise aux points critiques | 93 |
| IV.3.5. Choix des opérations de surveillance | 93 |
| IV.3.6. Réalisation du contrôle | 93 |
| IV.3.7. Actions correctives | 93 |
| IV - 4 L'auto-contrôle | 93 |

II - LES AGENTS ANTIMICROBIENS

| | |
|--|-----|
| I - GENERALITES/TERMINOLOGIE | 94 |
| I - 1 Stérilisation | 94 |
| I - 2 Désinfectants | 94 |
| I - 3 Antiseptiques | 94 |
| I - 4 Conservateurs alimentaires | 95 |
| I - 5 Sulfamides et antibiotiques | 95 |
| II - LOIS DE DESTRUCTION DES MICROORGANISMES | 95 |
| II - 1 Généralités | 95 |
| II - 2 La cellule microbienne et l'antimicrobien. | |
| La mort microbienne | 97 |
| III - FACTEURS INFLUENÇANT L'ACTION ANTIMICROBIENNE | 97 |
| III - 1 Le microorganisme | 97 |
| III - 2 Le temps de traitement | 98 |
| III - 3 L'agent antimicrobien | 98 |
| III - 4 L'environnement | 98 |
| IV - AGENTS PHYSIQUES | 98 |
| IV - 1 La chaleur | 98 |
| IV.1.1. Terminologie-Définitions | 99 |
| IV.1.2. Les principaux paramètres d'évaluation des effets des traitements thermiques | 100 |
| IV.1.3. Facteurs de résistance à la chaleur | 102 |
| IV.1.4. Technologies | 103 |
| IV - 2 Radiations | 103 |
| IV.2.1. Radiations électromagnétiques | 103 |
| IV.2.2. Radiations électroniques | 108 |
| IV.2.3. Radiations soniques | 108 |
| IV - 3 Elimination mécanique | 108 |
| IV.3.1. Filtration stérilisante | 108 |

| | | |
|--------|--|-----|
| | IV.3.2. Centrifugation | 108 |
| IV - 4 | Microondes | 108 |
| IV - 5 | Hautes pressions en présence ou non de gaz | 109 |
| V - | AGENTS CHIMIQUES | 109 |
| V - 1 | Les antiseptiques, les désinfectants et les conservateurs alimentaires | 109 |
| | V.1.1. Mode d'action | 110 |
| | V.1.2. Classification | 110 |
| | V.1.2.1. Agents oxydants | 110 |
| | V.1.2.2. Les métaux lourds et leurs sels | 113 |
| | V.1.2.3. Les alcools | 113 |
| | V.1.2.4. Les phénols | 115 |
| | V.1.2.5. Les savons et détergents | 116 |
| | V.1.2.6. Les agents alkylants | 117 |
| | V.1.2.7. Les colorants | 117 |
| | V.1.2.8. Les conservateurs alimentaires | 118 |
| | V.1.2.9. Antiseptiques de la famille des biguanidines, des salicylanilides ou des carbanilides | 121 |
| | V.1.3. Stérilisation par les gaz | 121 |
| | V.1.3.1. Le formol | 121 |
| | V.1.3.2. L'oxyde d'éthylène | 121 |
| | V.1.3.3. La b-propionolactone | 121 |
| | V.1.3.4. Le SO ₂ | 122 |
| | V.1.3.5. Les essences volatiles | 122 |
| | V.1.3.6. Ozone | 122 |
| | V.1.3.6. L'anhydride carbonique sous pression | 122 |
| | V.1.4. Mesure de l'activité microbicide | 122 |
| | V.1.4.1. Mesure du coefficient phénol | 122 |
| | V.1.4.2. Méthode des portes germes | 123 |
| | V.1.4.3. Méthode de dénombrement | 123 |
| V - 2 | Quelques notions sur les agents chimiothérapeutiques | 123 |
| | V.2.1. Mode d'action biochimique des antibiotiques | 124 |
| | V.2.1.1. Inhibition de la synthèse d'un constituant de la cellule | 124 |
| | V.2.1.2. Action sur la membrane cytoplasmique | 124 |
| | V.2.1.3. Analogie stérique avec des métabolites | 124 |
| | V.2.1.4. Action sur les protéines plasmatiques | 125 |
| | V.2.1.5. Inhibition de systèmes enzymatiques importants de la production d'énergie | 125 |
| | V.2.2. Modalités de l'action antimicrobienne | 125 |
| | V.2.3. Détermination de la sensibilité bactérienne in vitro aux antibiotiques | 126 |
| | V.2.3.1. Méthode de dilution en milieu liquide | 126 |
| | V.2.3.2. Méthode de diffusion en milieu solide | 127 |
| | V.2.4. Les sulfamides et les nitrofuranes | 129 |
| | V.2.5. Les agents antituberculeux | 129 |
| | V.2.6. Les antibiotiques | 129 |