

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE MAISON ALFORT

Année : 2001

n°:

LE SEL ET LES MICROORGANISMES

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le 25 octobre 2001

Par

Erwan LOZACH

Né le 4 décembre 1971 à PANTIN (Seine Saint Denis)

JURY

Président : M. ADNOT

Professeur à la faculté de médecine de Créteil

Membres :

Directeur : Monsieur CARLIER V.

Professeur à l'école nationale vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Monsieur BOULOUIS H.J.

Professeur à l'école nationale vétérinaire d'Alfort

TABLE DES MATIERES

I – LE SEL ET SES RESSOURCES.....	6
A – PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES.....	6
1 – Propriétés générales	6
2 – Etude particulière : rôle dépresseur de l'activité de l'eau	8
B – TECHNIQUES DE PRODUCTION DU SEL	12
1 – La méthode agricole.....	12
2 – La méthode minière.....	14
3 – La méthode thermique.....	15
II – LE SEL UTILISE EN AGRO-ALIMENTAIRE COMME AGENT CONSERVATEUR.....	16
A – ACTION « DESHYDRATANTE » DU SEL SUR LES ALIMENTS	16
1 - Les aliments dans lesquels le sel est incorporé comme ingrédient	16
2 – Action du sel sur les aliments.....	20
3 – Sel et conservation des aliments deshydratés.....	33
B – LE SEL SELECTIONNE LES MICRO-ORGANISMES.....	38
1 – Relations A_w – réactions enzymatiques.....	38
2 – Relation A_w – croissance microbienne.....	40
3 – Rôles spécifiques du sel	55
4 -Déterminisme de la résistance au sel	56
5 – Les micro-organismes des denrées alimentaires animales et leur A_w optimales.....	58
III - INTERETS ET LIMITES DU SEL EN AGRO-ALIMENTAIRE	62
A – FACTEURS DE DEVELOPPEMENT DES MICRO-ORGANISMES DANS LES ALIMENTS SALES.....	62
1 – Importance de la contamination initiale	62
2 – L' A_w et les autres paramètres physico-chimiques.....	64
B – LES ALTERATIONS DES PRODUITS SALES	64
1 – Dégradations	64
2 – Altérations recherchées : la maturation	76
IV – LE SEL COMME BIOTOPE D'INTERET INDUSTRIEL.....	81
A – UNE DIVERSITE MICROBIENNE.....	81
1 – Les Halobactéries	81
2 – Virus et champignons.....	89
3 – Le sel : un biotope de plus en plus exploré	89
B – LES ADAPTATIONS A LA VIE EN MILIEU HYPERSALE : UN PACTE MOLECULAIRE AVEC LE SEL	90
1 – Régulation de la pression osmotique et maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire.....	91
2 – Des protéines « adaptées »	92
3- Synthèse d'ATP	93
C – INTERETS INDUSTRIELS DES MICRO-ORGANISMES HALOPHILES	96
1 - Les exopolysaccharides (EPS) des bactéries marines.....	96
2 – La bactériorhodopsine.....	97

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - La molécule d'eau.....	27
Figure 2 - Arrangement particulier des molécules d'eau autour des ions chlorure et sodium.....	27
Figure 3 - Courbe générale représentant l'isotherme de sorbtion d'un aliment.....	28
Figure 4 - Courbes de sorption.....	29
Figure 5 - Représentation schématique de la couche.....	29
Figure 6 - Représentation schématique de la couche multimoléculaire dans la zone B de l'isotherme de sorption.....	30
Figure 7 - Représentation schématique de l'eau sous tension dans les capillaires de la zone C de l'isotherme de sorption.....	30
Figure 8 - Eau solvante mesurée sur la courbe de sorption.....	30
Figure 9 - Influence du pH sur les charges protéiques.....	35
Figure 10 - Influence du pH sur la capacité de rétention d'eau d'un broyat de chair.....	35
Figure 11 - Influence du sel sur la capacité de rétention d'eau d'un broyat à différents pH.....	35
Figure 12 - Teneur en sel du muscle à l'équilibre en fonction de la concentration de la saumure à différentes températures.....	36
Figure 13 - Teneur en eau du muscle à l'équilibre en fonction de la concentration de la saumure à différentes températures.....	36
Figure 14 - Volume du muscle à l'équilibre en fonction de la concentration de la saumure à différentes températures.....	36
Figure 15 - Relation entre l'humidité optimale de conservation M_o d'aliments déshydratés et l'activité de l'eau A_w	37
Figure 16 - Relation entre a_w , teneur en eau M_o , des aliments et l'énergie de sorption Q_s	37
Figure 17 - Diagramme des différents états de l'eau en relation avec l'isotherme de sorption.....	37
Figure 18 - Croissance des micro-organismes en fonction de l'activité de l'eau.....	42
Figure 19 - Représentation schématique de l'isotherme de stabilité intégrant les taux d'altérations chimiques, enzymatiques et microbiologiques, en fonction de l'activité de l'eau.....	42
Figure 20 - Relation entre isotherme de sorption et activité enzymatique.....	43
Figure 21 - Relation HR-vitesse de réaction de la peroxydase (▼) et de la lipoxydase (■).....	43
Figure 22 - Relation entre activité de l'eau et croissance pour cinq microorganismes. (1) <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ; (2) <i>Salmonella oranienburg</i> ; (3) <i>Staphylococcus aureus</i> ; (4) <i>Halobacterium halobium</i> ; (5) <i>Xeromyces bisporus</i>	43
Figure 23 - Effet de l'abaissement de l' A_w sur la croissance des bactéries.....	44
Figure 24 - Réactions physiologiques de l'osmorégulation des bactéries.....	44
Figure 25 - Courbes de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> C-243 en milieu de culture ajusté à diverse A_w avec des protéines hydrolysées.....	45
Figure 26 - Effet de l' A_w sur le taux de croissance de <i>Salmonella oranienburg</i>	45
Figure 27 - Croissance de <i>St. Aureus 196 E</i> dans la bouillie de chair de crevette à différentes activités de l'eau.....	45
Figure 28 - Croissance de <i>St. Aureus C 243</i> dans de la bouillie de chair de crevettes à différentes activités de l'eau.....	45
Figure 29 - Courbes de croissance de <i>Geotrichoïdes sp.</i> à diverses A_w sur tranches de muscles.....	51
Figure 30 - Relations entre taux de croissance et A_w de quatre moisissures : <i>Aspergillus niger</i> à 20 °C.....	51
Figure 31 - Effet de l' A_w sur la synthèse de l'entérotoxine B de <i>St. Aureus</i>	51
Figure 32 - Effet de l' A_w et du pH conjugués sur la croissance des microorganismes.....	54
Figure 33 - Relation entre tolérance au CO ₂ et A_w à -1 °C pour.....	54
Figure 34 - Courbes de croissance des bactéries en fonction de la contamination initiale.....	63
Figure 35 - Durée d'apparition des altérations d'odeur d'une carcasse de mouton en fonction de la contamination initiale et de la température de conservation.....	63
Figure 36 - La maturation des poissons marinés ou salés.....	79
Figure 37 - Dénombrements bactériens dans la saumure de harengs salés.....	79
Figure 38 - Azote total et différentes fractions azotées solubles dans les filets de harengs au cours de la maturation (valeurs exprimées en % de la teneur en azote du hareng à l'emballage).....	79
Figure 39 - Arbre phlogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ARN 16S.....	84
Figure 40 - Bactériorhodopsine enchassée dans la bicouche lipidique.....	95
Figure 41 - Photocycle de la bactériorhodopsine.....	95

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I – Principales caractéristiques du chlorure de sodium	6
Tableau II – Influence du sel sur l’activité de l’eau.	11
Tableau III – Composition des différents sels (en %)	12
Tableau IV – Composition ionique de quelques saumures naturelles.....	13
Tableau V – Principaux agents dépresseurs et activités de l’eau approximative pour divers aliments	19
Tableau VI – Aw des aliments et microbes.....	21
Tableau VII – Activité minimum de l’eau permettant la croissance des micro-organismes.....	41
Tableau VIII – Les champignons xérophiles connus et leurs Aw minimales	48
Tableau IX - Effets de Aw sur la croissance et la formation de mycotoxines par quelques moisissures.	50
Tableau X - Mycotoxines isolées de champignons xérophiles.....	52
Tableau XI – Comportement de quelques groupes microbiens en fonction du milieu.....	53
Tableau XII – Principales bactéries rencontrées dans les denrées alimentaires d’origine animale.....	58
Tableau XIII - Aw minimales pour la croissance des micro-organismes de la viande et des produits carnés	60
Tableau XIV – Barème de cotation du poisson : indice d’altération	69
Tableau XV - Caractéristiques des différents genres d’Halobactéries.....	87
Tableau XVI – Lieux d’isolement des souches d’ <i>Halobacterium</i>	88
Tableau XVII – Lieux d’isolement des souches d’ <i>Haloarcula</i>	88
Tableau XVIII – Lieux d’isolement des souches d’ <i>Haloferax</i>	88
Tableau XIX – Lieux d’isolement des souches de <i>Natronobacterium</i>	88
Tableau XX - Principaux renseignements permettant l’identification des champignons connus se développant autour d’une Aw de 0.85	110
Tableau XXI - Identification des moisissures par culture comparée sur milieux CA, C20S et MY40G après une ou plusieurs semaines d’incubation à 22-28°C.	110
Tableau XXII - Eléments morphologiques d’identification des moisissures D’après les aspects microscopiques sur milieu MY40G	111
Tableau XXIII - Fréquence relative des divers agents étiologiques identifiés dans 592 anadémies aux USA entre 1972 et 1976.....	116
Tableau XXIV - Germes responsables des anadémies de toxi-infections déclarées en France de 1970 à 1977.....	116
Tableau XXV - Aliments responsables des anadémies de toxi-infection Déclarés en France de 1970 à 1977.....	119
Tableau XXVI – Phytoplancton et phycotoxines.....	135

TABLE DES ANNEXES

<u>ANNEXE 1</u> : Modélisations mathématiques des isothermes de sorption.....	99
<u>ANNEXE 2</u> : Identification des micro-organismes des denrées alimentaires.....	100
<u>ANNEXE 3</u> : Maladies contractées par consommation d'aliments salés ou par contamination des plaies en milieu marin.....	112

INTRODUCTION

Nul produit n'est peut-être d'un usage plus courant que le sel ou chlorure de sodium. Nulle substance n'est, en tout cas, plus répandue puisque, dissous en quantité inépuisable dans l'eau des mers (30 g / l), le sel se trouve couvrir, sous cette forme, les trois quarts du globe, sans parler des mers intérieures, des lacs salés et des nombreux gisements de sel gemme qui existent dans presque tous les pays.

En raison de son usage alimentaire primordial et de son rôle millénaire dans la conservation des aliments, le sel a toujours été un produit de première nécessité qui, si commun soit-il, a été l'un des biens les plus recherchés et les plus estimés.

En effet, le sel « universel » fut pendant longtemps une grande préoccupation, une grande quête de l'humanité. D'abord, parce qu'on ne connaissait pas toutes ses sources, parce qu'on ne savait pas très bien l'obtenir et qu'on en gaspillait. Aussi, parce qu'il fallait le transporter, problème longtemps capital. Le sel a animé d'intenses trafics, fait l'objet de spéculations de la part des producteurs, suscité l'angoisse des consommateurs rarement assurés pour longtemps d'un ravitaillement satisfaisant. Il a justifié des stratégies marchandes et politiques, enrichi les uns, appauvri les autres. En somme, le sel a joué pour des dizaines de générations le rôle que la nôtre assigne au pétrole.

Tous les aliments contiennent de l'eau ; ceux présentant habituellement les plus fortes teneurs en eau sont réputés être les plus sensibles à une altération rapide biologique et chimique, parce que cet excès d'eau présuppose qu'une certaine quantité est « disponible » pour permettre à diverses réactions de s'établir et de se poursuivre. Il était donc naturel d'enlever l'eau pour diminuer sa disponibilité, c'est à dire son activité. Cette dernière affecte notamment la susceptibilité à l'attaque de micro-organismes. Ces micro-organismes sont définis comme des êtres vivants microscopiques tels que bactéries, virus, champignons microscopiques (levures) et les protistes c'est à dire des organismes unicellulaires Eucaryotes d'affinité végétale (Protophytes) ou bien d'affinité animale (Protozoaires). Et, c'est essentiellement en réduisant cette activité de l'eau que les techniques ancestrales préservaient les aliments de ce risque. L'eau sert de solvant aux éléments solubles constituant les aliments ; tout procédé destiné à éliminer l'eau, tel le séchage, concentre les éléments solubles dans la phase aqueuse restante. Plutôt que d'éliminer l'eau, il est possible d'ajouter des solutés qui « immobiliseront » une partie de l'eau, c'est le cas du salage.

De nos jours le sel est encore largement utilisé en industries agro-alimentaires en tant qu'agent conservateur ; seules les techniques de salage ont évoluées. Il demeure l'additif de choix en industrie halieutique et reste largement incorporé dans les produits carnés et les produits dérivés de l'industrie laitière.

Néanmoins des altérations ainsi que des pathologies liées à la consommation de produits salés surviennent régulièrement. Le sel, selon sa teneur, sélectionne des micro-organismes aptes halorésistants c'est à dire capable de proliférer en milieu salé. Or le salage des aliments doit être compatible avec la consommation mais doit également suivre les exigences des consommateurs qui par souci de problèmes de santé réclament des teneurs en sel de plus en plus restreintes. C'est une des raisons pour lesquelles il est le plus souvent associé à d'autres agents dépresseur de l'activité de l'eau.

Par ailleurs, le sel peut abriter des micro-organismes dits halophiles qui nécessitent de fortes concentrations en sel pour leur croissance ; le sel constituant alors un véritable biotope pour ces espèces.

I – LE SEL ET SES RESSOURCES

A – PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

1 – Propriétés générales

Le sel de cuisine est le nom commun du chlorure de sodium, de formule chimique NaCl, produit formé de l'association de deux ions : le cation sodium Na⁺ (39 % en poids du sel) et l'anion chlorure Cl⁻ (61 %). A des degrés divers, les sels habituellement commercialisés renferment, outre le constituant principal (chlorure de sodium NaCl), d'autres corps en quantité plus ou moins importante, tels que des matières insolubles dans l'eau (argiles, sable ou marnes), des sulfates de calcium ou de magnésium, des chlorures alcalino-terreux et autres halogénures alcalins. Si, pour certains usages, la pureté doit être la plus grande possible, il existe d'autres cas où les compagnons du sel sont sans inconvénients, voire bénéfiques (16).

Les principales caractéristiques du chlorure de sodium sont résumées dans le tableau I.

Tableau I – Principales caractéristiques du chlorure de sodium D'après Kaufmann (Colas (16))

Nom minéralogique	Halite
Cristallisation	Cubique
Formule chimique	NaCl
Indice de réfraction	1.544
Masse moléculaire	58.45
Densité du monocristal	2.165
Densité du liquide à 801 °C	1.549
Dureté (indice MOHS)	2 à 2.5
Chaleur spécifique	0.22kcal/kg/°C
Solubilité dans l'eau froide (0 °C)	357 g/1000 g d'eau
Solubilité dans l'eau chaude (100 °C)	391 g/1000 g d'eau
Température d'ébullition de la saumure saturée (*)	108.8 °C
Température de fusion (*)	801 °C
Température d'ébullition du sel fondu (*)	1 449 °C
Chaleur latente de dissolution (à saturation) (*)	7.8 kcal/kg
Chaleur latente de fusion (*)	97 kcal/kg
Chaleur latente d'ébullition (*)	698 kcal/kg

(*) A la pression atmosphérique

Le chlorure de sodium cristallise dans le système cubique. Son monocristal est un cube de 5.63 angströms de côté, de densité 2.165. En général, on voit se développer de belles trémies dans les sels de mer ou les sels ignigènes. En présence de ferronitriles alcalins ou alcalino-terreux, le sel cristallise sous forme dendritique, c'est à dire en étoiles arborescentes, comme des cristaux de neige, formés de dendrites. Ce sel, dont les cristaux sont particulièrement fragiles, se caractérise par sa faible densité apparente : 0.6 contre 1 à 1.2 pour le sel fin classique d'évaporateur, sa grande vitesse de dissolution et son caractère naturellement antimottant. De ce fait, le sel dendritique est particulièrement apprécié dans certains pays où l'air est très humide, comme le Nigeria.

Les autres caractères les plus intéressants du sel, dont découlent beaucoup d'autres, sont : l'avidité pour l'eau, la solubilité et la conductivité (16).

- Avidité pour l'eau

Le sel attire naturellement l'eau : on dit qu'il s'agit d'un produit hygroscopique. A toutes températures, la pression ou tension de vapeur d'eau d'une saumure, c'est à dire la pression qui s'établit à l'équilibre dans un vase clos partiellement rempli de saumure et désaéré, est inférieure à celle de l'eau pure : cet abaissement de la tension de vapeur est d'autant plus important que la saumure est plus concentrée. La tension de vapeur d'eau se trouvant dans le film, ou la pellicule de saumure saturée entourant les cristaux de sel, tend à s'équilibrer avec la pression partielle de la vapeur d'eau dans l'air environnant. Si, donc, un cristal de sel est au contact d'un air dont la pression partielle de vapeur d'eau est supérieure à celle de la saumure saturée, le transfert d'eau de l'air sur le sel se poursuivra jusqu'à dissolution complète du chlorure de sodium. La saumure saturée ainsi formée continuera à absorber de l'eau et à se diluer aussi longtemps que la pression partielle de vapeur d'eau de l'air restera supérieure à la tension de vapeur de la saumure. Il y a dessiccation de l'air.

Le phénomène inverse a lieu de la même façon ; si une saumure est au contact d'un air dont la pression de vapeur d'eau est inférieure à la tension de vapeur de cette saumure, il y aura évaporation de l'eau de la phase liquide. La saumure se concentrera jusqu'à saturation, puis, à ce stade, déposera du sel. L'application typique de ces conditions est réalisée sur un marais salant et elle est utilisée aussi pour le séchage du sel placé dans un air chaud et sec. L'addition de différents produits au sel permet de combattre les inconvénients résultant de sa nature hygroscopique, qui peut entraîner une mauvaise coulabilité ou même une reprise en masse.

- Solubilité

Totalement insoluble dans l'acide chlorhydrique (HCl), le sel est faiblement soluble dans l'alcool, légèrement soluble dans l'ammoniac et soluble dans la glycérine (93 g de sel par kg). La solubilité dans l'eau est importante (environ 360 g de sel par kilogramme d'eau). Elle varie peu avec la température.

Cette variation de solubilité est cependant utilisée dans certains procédés de production de sel ignigène, comme le procédé à détente étagée, la pompe à sel ou

celui des poêles de circulation. Pour des températures comprises entre 0 °C et – 21.12 °C (point d'eutexie), la solution saturée de chlorure de sodium est en équilibre, non pas avec le chlorure de sodium, mais avec son dihydrate (NaCl, 2H₂O). En dessous de – 21.12 °C, la solution saturée cristallise totalement. Enfin, la dissolution du sel étant endothermique (7.8 Kcal / kg), cette propriété peut être utilisée pour obtenir un refroidissement.

- Conductivité

Le sel fondu et le sel en solution aqueuse sont de bons conducteurs du courant électrique : le sel est un électrolyte. Cette propriété importante est utilisée dans l'industrie productrice du chlore, de la soude et du sodium. Elle a aussi pour conséquence fâcheuse que les solutions salines favorisent les phénomènes de corrosion de certains métaux, en particulier le fer et l'acier.

2 – Etude particulière : rôle dépresseur de l'activité de l'eau

a – L'activité de l'eau

L'eau présente dans les tissus biologiques est plus ou moins disponible. On distingue très schématiquement l'eau liée de l'eau libre avec des intermédiaires d'eau plus ou moins libres ou liés (71).

Rappelons tout d'abord que la thermodynamique nous enseigne qu'un biosystème en équilibre à température et pression constante est caractérisé par G : « l'enthalpie libre » (énergie libre de Gibbs) énergie disponible et récupérable pour fournir du travail. Les expressions classiques des deux premiers principes de la thermodynamique s'inscrivent ainsi :

$$G = H - TS \quad (1)$$

$$H = U + PV \quad (2)$$

$$G = U + PV - TS \quad (3)$$

Dans lesquelles :

P = pression totale

T = température

V = volume

H = fonction « enthalpie » (ou chaleur totale)

S = fonction « entropie »

U = fonction « énergie interne »

L'énergie interne U correspond à la somme des énergies de toutes les particules qui constituent le système ; l'enthalpie H correspond à la chaleur totale mise en jeu et l'entropie S correspond au degré d'ordre et d'organisation des particules. L'entropie est une grandeur qui permet d'évaluer la dégradation de l'énergie d'un biosystème.

Lorsque des solutés sont dissous dans l'eau, l'entropie diminue à mesure que les molécules d'eau s'orientent vers les molécules de soluté. Les molécules d'eau sont moins libres de migrer de la phase liquide vers la phase vapeur et la pression de vapeur d'eau est abaissée. Dans le cas d'une solution idéale, la relation entre la concentration et la pression de vapeur est donnée par la loi de Raoult : l'abaissement relatif de la pression de vapeur du solvant est égal à la fraction molaire du soluté. Si un corps A est en mélange avec d'autres constituants dans une solution idéale, la pression partielle de vapeur (p_a) au-dessus de la solution est proportionnelle à sa fraction molaire (X_a) dans la solution :

$$p_a = p_{oa} \cdot X_a \quad (4)$$

p_{oa} étant la pression du corps pur A à la même température. Dans la plupart des cas la solution n'est pas idéale et il est nécessaire de corriger par l'utilisation d'un coefficient sans dimensions : « le coefficient d'activité γ spécifique du corps considéré. L'équation (4) devient :

$$p_a = p_{oa} \cdot X_a \cdot \gamma_a \quad (5)$$

Dans le cas qui nous intéresse, celui de l'eau, « l'état de référence » choisi est celui de l'eau pure libre (surface plane) en équilibre avec sa vapeur saturante à même température et pression que dans l'aliment considéré (l'eau fixée dans le biosystème). S'il y a équilibre thermodynamique, la relation (5) est valable, et elle s'écrit :

$$p = p_o X \gamma \quad (6)$$

Mais la fraction molaire X n'est pas facile à atteindre, on étudie plutôt le produit : fraction molaire X coefficient d'activité ($X\gamma$)

$$X\gamma = p / p_o \quad (7)$$

Dans le cas de l'eau on donne à $X\gamma$ le nom « d'activité de l'eau » et on l'exprime A_w du terme anglo-saxon « activity water »

$$A_w = p / p_o \quad (8)$$

p = pression partielle de vapeur d'eau dans le biosystème et p_o = la pression de vapeur d'eau pure (état de référence) à la même température.

La loi de Raoult peut s'écrire différemment :

$$A_w = (n_w / (n_w + n_s)) \cdot \gamma_w = X_w \cdot \gamma_w \quad (9)$$

Dans laquelle n_w et n_s sont, respectivement, le nombre de molécules d'eau dans le mélange et le nombre de moles de solutés, γ_w le coefficient d'activité de l'eau qui tend vers 1 lorsque la solution tend vers la dilution infinie et X_w la fraction molaire de l'eau.

Comme 1 Kg d'eau contient 55,51 moles, 1 mole d'un soluté idéal dissous dans 1 Kg d'eau abaisse la pression de vapeur de :

$$1 / (1 + 55,51) = 0,0177 \text{ c'est à dire de } 1,77 \%$$

Pour une solution molaire la pression de vapeur est :

$$55,51 / (1 + 55,51) = 0,9823 \text{ soit } 98,23 \% \text{ de l'eau pure}$$

Ainsi dans l'exemple ci-dessus, la solution molaire a une A_w de 0,9823.

Si dans un biosystème il y a plusieurs constituants, dont le nombre de moles = i , répartis indifféremment dans les trois phases solide, liquide, vapeur, en équilibre thermodynamique, on démontre que le « potentiel chimique » (μ_i) d'un constituant est le même dans chaque phase. Au lieu de ce potentiel, il est plus facile d'utiliser « l'activité absolue » (λ_i) qui lui est relié par l'équation :

$$\mu_i = RT \log_e \lambda_i \quad (10)$$

Le rapport de l'activité absolue à l'activité d'un état de référence est « l'activité relative » (nombre sans dimension de 0 à 1). Le rapport activité relative/fraction molaire X_i est le coefficient d'activité γ déjà cité plus haut. L'activité de l'eau (A_w) est un paramètre thermodynamique. Par rapport au potentiel chimique de l'eau ($\mu =$ potentiel chimique de l'eau dans le produit, $\mu_o =$ potentiel chimique de l'eau pure à la même température T , à la même pression P), l' A_w se définit d'après l'équation (9) de la manière suivante :

$$-\Delta \bar{F} = \mu_{(p,T)} - \mu_{o(p,T)} = RT \log_e A_w \quad (11)$$

$\mu - \mu_o$ représente l'énergie libre molaire partielle $-\Delta \bar{F}$, variation d'énergie libre correspondant au passage d'une mole d'eau d'un système à l'autre.

Imaginons un aliment placé dans une atmosphère humide, des échanges de vapeur d'eau et de chaleur s'effectuent entre les deux phases jusqu'à établissement de l'équilibre thermodynamique ; les températures sont alors constantes et égales. L'eau existe d'une part dans l'aliment où l'on peut y mesurer l' A_w et la teneur en eau, d'autre part dans l'air où l'on peut mesurer la pression partielle de vapeur d'eau ou encore « l'humidité relative » (HR), celle-ci est le rapport de la pression p à la pression saturante p_o de l'eau pure à la même température (T) :

$$HR = p / p_o(T) \cdot 100 \quad (12)$$

Dans les conditions d'équilibre thermodynamique (si l'on considère la vapeur d'eau comme un gaz parfait) on peut écrire la relation :

$$A_w = p / p_o = HRE / 100 \quad (13)$$

HRE est « l'humidité relative d'équilibre ». L'eau pure a une A_w de 1 et l'atmosphère à l'équilibre une HRE de 100 %. L' A_w est pratiquement inaccessible à la mesure directe et, c'est grâce à l'équivalence (13) que l'on peut mesurer l' A_w en mesurant l'HRE de l'air environnant en équilibre avec l'aliment. Cette relation est donc fondamentale car elle donne le moyen le plus simple pour déterminer l' A_w des aliments solides par mesure de l'HRE. Mais il convient de souligner que :

- cette relation n'est vérifiée qu'à l'équilibre entre les deux phases vapeur et condensat et que ce n'est que dans ce cas que l'on peut utiliser indifféremment l'un pour l'autre A_w et HRE
- les deux concepts sont différents parce que :
 - l' A_w se réfère au potentiel chimique, à l'énergie libre du biosystème
 - l'HR se réfère à la pression partielle de vapeur d'eau dans l'atmosphère

L' A_w donne une estimation quantifiable de la concentration efficace relative de l'eau dans le produit alimentaire par rapport à l'eau pure. Cette valeur sera extrêmement intéressante à connaître parcequ'elle permettra d'évaluer l'efficacité potentielle de l'eau dans les réactions d'altération chimique au cours des traitements technologiques et de la conservation (oxydations, dénaturations, réactions enzymatiques, réactions de Maillard) ou biologiques (prolifération bactérienne) (71).

b – Influence du sel sur l'activité de l'eau

L'activité de l'eau des solutions aqueuses ne contenant que du NaCl varie selon le tableau ci-dessous :

Tableau II – Influence du sel sur l'activité de l'eau (71).

A_w	Concentration en NaCl	
	Molaire	% poids : volume
0.995	0.15	0.9
0.99	0.30	1.7
0.98	0.61	3.5
0.96	1.20	7
0.94	1.77	10
0.92	2.31	13
0.90	2.83	16
0.88	3.33	19
0.86	3.81	22

L'activité de l'eau diminue au fur et à mesure que la concentration en chlorure de sodium augmente.

L'activité de l'eau d'une solution saturée en sel est de 0.75 ; c'est encore insuffisamment bas pour empêcher certaines altérations (71).

B – TECHNIQUES DE PRODUCTION DU SEL

Le sel se trouve partout, dans la mer et dans le sol. Sa grande abondance est une curiosité de la nature. Les principaux procédés de production intentionnelle de sel peuvent être classés en trois catégories : la méthode agricole, la méthode minière et la méthode thermique. Le tableau III nous indique la composition des différentes productions en fonction de leur origine.

Tableau III – Composition des différents sels (en %) (16)

Composition en % sur sec						
Sels	NaCl	Insolubles à l'eau	Solubles à l'eau			
			MgSO ₄	MgCl ₂	CaSO ₄	Na ₂ SO ₄
Sel gemme	93 à 99.5	0.1 à 5		0.05	0.4 à 1.7	
Sel de mer	98 à 99.8	0.03 à 1	0.005 à 0.12	0.015 à 0.3	0.11 à 0.42	
Sel ignigène	Plus de 99.9	Moins de 0.01			0.01 à 0.3	0.01 à 0.05

1 – La méthode agricole

Cette méthode mise en œuvre dans les marais salants, ou salins, utilise l'énergie solaire dont découle le vent pour produire, à partir d'eau de mer, du sel de mer. Quelques marais salants évaporent toutefois des saumures d'origine terrestre et produisent alors du sel solaire.

Des mers fermées, des lacs salés, des chotts, des sources salées peuvent également être à l'origine d'une production de ce type. La production de sel cristallisé par évaporation naturelle comporte deux phases successives :

- la concentration de la saumure jusqu'à la saturation (qui, pour l'eau de mer, se situe à 260 g / L de chlorure de sodium) ;
- la cristallisation du sel à partir de la saumure ainsi saturée

a – l'eau de mer et les saumures

- Composition de l'eau de mer

La salinité de l'eau des mers est voisine de 3.5 %, ce qui correspond à une densité de 1.026. Dans les océans, la salinité varie de 3.36 % à 3.68 %. L'incidence de la dilution (pluie ou fleuves) ou de la concentration (évaporation) est plus marquée dans le cas des mers fermées ou semi-fermées. Malgré ces différences importantes de salinité, les éléments majeurs : NaCl, MgCl₂, MgSO₄, CaSO₄ et KCl restent sensiblement en proportion constante d'une mer à l'autre ; seule la teneur en eau varie.

Dans 100 g de sels dissous, il y a environ

- 77 g de NaCl
- 10 g de MgCl₂
- 6 g de MgSO₄
- 3.9 g de CaSO₄
- 2 g de KCl

Cette liste n'est pas complète. Tous les éléments naturels sont en effet présents dans l'eau de mer à l'état de traces.

b – Autres sources de saumures

Le chlorure de sodium est également produit sur des salins à partir d'autres sources naturelles de saumure que la mer. Il s'agit principalement des lacs salés et des chotts, situés dans les régions sèches ou arides du globe. Ces masses d'eau fermées, soumises à des évaporations intenses, ont évolué au gré des apports de sels provenant du lessivage des terrains environnants par les eaux de surface, et du dépôt des sels les moins solubles. La composition de leurs eaux est donc très diverse, selon l'histoire géologique de chaque site. L'utilisation de ces saumures pour la récupération des sels contenus est toujours un cas particulier et se révèle un processus complexe. Le tableau IV indique, à titre d'exemple, la composition ionique des saumures (en kg / t) de la mer Morte, du grand lac salé de l'Utah et, pour permettre la comparaison, celle de l'eau des océans.

Tableau IV – Composition ionique de quelques saumures naturelles (16).

kg / t				
Composants		Mer morte	Grand lac salé. Utah	Océans
Sodium	Na ⁺	32	67.3	10.8
Magnésium	Mg ⁺⁺	35.7	5.6	1.3
Calcium	Ca ⁺⁺	12.7	0.3	0.4
Potassium	K ⁺	6.4	3.4	0.4
Chlorure	Cl ⁻	178.6	112.9	19.4
Sulfate	SO ⁴⁻⁻	0.4	13.6	2.7
Bicarbonate	HCO ⁻³	Traces	0.2	0.1
Bromure	Br ⁻	3.2	Traces	0.1

Enfin, certains salins utilisent pour leur alimentation des saumures de sondage, obtenues par le lessivage, in situ, d'un gisement de sel gemme. La composition de ces saumures est extrêmement variable selon le gisement.

c – Composition des saumures marines pendant la concentration et la cristallisation

Lors de l'évaporation de l'eau de mer ou d'une autre saumure, divers sels, dont le chlorure de sodium, se déposent successivement à des degrés de saturation différents : c'est la cristallisation. Dans le cas de l'eau de mer, le premier sel qui est déposé est le sulfate de calcium, sous forme de gypse ($\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$). Son dépôt débute quand la saumure atteint une densité de 1.109. A la densité de 1.216, c'est à dire quand le chlorure de sodium commence à cristalliser, 80 % du sulfate de calcium est déjà précipité.

Dans les marais salants, la cristallisation est volontairement arrêtée quand la densité atteint un certain niveau, par exemple 1.262 ; la saumure contient alors environ 40 g / l de magnésium (Mg^{++}). Le sel qui cristallise au-delà de cette concentration a un goût de plus en plus amer et un très faible grenage. De plus, l'évaporation des saumures très denses, donc magnésienne, est de plus en plus lente. La production s'en ressent évidemment. Si l'on concentre encore les saumures, appelées eaux mères une fois qu'elles ont déposé le chlorure de sodium, ce qui se pratique sur certains marais salants, on précipite alors, selon les conditions de température, différents sels de sodium, magnésium et potassium, notamment le sulfate de magnésium. Le processus devient alors de plus en plus complexe.

Pour produire 1 kg de sel, il faut utiliser environ 37 kg d'eau de mer dont 90 % sont évaporés pendant la phase de concentration, 7 % pendant celle de cristallisation du chlorure de sodium, 3 % restant dans les eaux mères.

Ainsi un salin est-il un gigantesque évaporateur horizontal et un des plus anciens utilisateurs de l'énergie solaire (16).

2 – La méthode minière

Les gisements de sel gemme sont très nombreux. Certains sont exploités depuis l'Antiquité, mais tous ne peuvent l'être. Pour la plupart des gisements actuellement en exploitation, on utilise, soit la méthode des chambres et piliers pour produire des sels solides, dit sel gemme, soit la dissolution avec de l'eau, amenée *in situ* par des sondages, pour produire des saumures saturées ou saumures de sondage (16).

Géologie des gisements de sel gemme :

Le sel gemme ou halite est une évaporite, c'est à dire une roche résultant de l'évaporation intense d'eau de mer, mais aussi d'eaux salées produites par le lessivage de dépôts préexistants. De par son origine, le sel gemme est souvent associé à d'autres évaporites telles que le sulfate de calcium sous forme de gypse et d'anhydrite, ou différents sels de potassium comme la sylvinite et la carnallite. Les évaporites, au même titre que les calcaires, les argiles et les grès, font parties des roches sédimentaires par opposition aux roches ignées (comme le granite et les basaltes) ou métamorphiques (comme le gneiss). Il faut toutefois noter que la vitesse de dépôt du

sel, variable mais pouvant dépasser 10 cm par an, est infiniment supérieure à celle des autres sédiments.

En France, les principaux gisements de sel son d'âge triasique (Lorraine, Champagne, Franche-Comté, Alpes et Sud-Ouest) et oligocène (Alsace, Bresse, Valentinois, Camargue et région de Manosque). La formation salifère la plus importante, celle du Keuper inférieur de Lorraine-Champagne, s'étend sur plus de 12000 km² ; sa puissance maximale est de 150 m, dont, en cumul, plus de 110 m de couches de sel. Les réserves sont estimées à plus d'un millier de milliards de tonnes.

La grande majorité des gisements se présente, soit en couches horizontales, soit sous forme d'énormes amas de sel, diapirs ou dômes. Ce sont les raisons pour lesquelles presque toutes les mines de sel du monde sont exploitées par la méthode des chambres et piliers abandonnés qui présente en outre l'avantage d'éviter l'effondrement des terrains sus-jacents et donc l'intrusion d'eau ou de saumure dans les travaux miniers, ce qui entraîne leur abandon.

L'exploitation concerne aussi une couche horizontale, d'une épaisseur régulière d'au moins deux mètres mais pouvant atteindre 40 m. L'une des plus importante mine de sel du monde (Borth, Solvay, RFA) exploite à 700 m de profondeur une couche de 20 m de sel très pur titrant plus de 99 % de NaCl. Les mines les plus profondes s'enfoncent jusqu'à 1000 m (16).

3 – La méthode thermique

Quand les conditions climatiques ne permettent pas de recourir à l'évaporation solaire, il est nécessaire d'utiliser une source de chaleur « artificielle » pour produire du sel à partir de saumure de sondage. La méthode thermique, mise en œuvre dans les *salines*, produit ainsi du *sel ignigène* par évaporation « artificielle » de saumures de sondage. Les *poêles*, grands récipients en tôle, dans lesquelles la saumure chauffée s'évaporait à l'air libre ont été presque toutes remplacées par des évaporateurs clos, qui permettent, dans des installations de *thermocompression* (recompression mécanique de vapeur) ou à *multiples effets*, d'économiser l'énergie en utilisant la vapeur résultant de l'évaporation.

Certaines salines sont alimentées en saumures d'origine marines. C'est notamment le cas au Japon, où *l'électrodialyse* qui utilise des membranes sélectives pour concentrer ou au contraire dessaler de l'eau de mer en présence d'un champ électrique intense permet de produire des saumures concentrées à partir de l'eau de mer.

D'autres salines utilisent pour leur alimentation du sel cristallisé (sel gemme ou quelquefois sel de mer) qu'elles dissolvent à chaud et recristallisent par *détente étagée* de la saumure saturée ainsi obtenue, ou dans une *pompe à sel*, utilisant la recompression mécanique de vapeur. Le *sel de flamme*, obtenu par fusion de sel gemme ou de sel ignigène, est encore produit dans quelques salines (16).

II – LE SEL UTILISE EN AGRO-ALIMENTAIRE COMME AGENT CONSERVATEUR

L'action du sel sur les micro-organismes s'apprécie surtout dans le domaine agro-alimentaire puisqu'il y est employé comme agent conservateur des denrées alimentaires. En effet, comme nous le verrons, le sel est un agent dépresseur de l'activité de l'eau dans les aliments et de ce fait un agent de stabilité microbiologique et qualité organoleptique.

A – ACTION « DESHYDRATANTE » DU SEL SUR LES ALIMENTS

1 - Les aliments dans lesquels le sel est incorporé comme ingrédient

a – Les utilisations courantes du sel dans les différentes industries alimentaires

- *Utilisation dans la charcuterie – salaisonnerie et conserverie des viandes :*

Parmi les 400 produits de salaison-charcuterie, il y a lieu de distinguer les « salaisons vraies », dans lesquelles le sel est réparti uniformément dans la viande à un taux supérieur à 5% et assure une conservation de plusieurs mois, et les « produits salés », dans lesquels le sel est réparti de façon parfois hétérogène, à un taux de 1 à 2% maximum, et dont le rôle est plus un assaisonnement qu'un rôle conservateur.

- *Utilisation dans les conserveries des légumes et la fabrication des bouillons et des potages :*

L'industrie de la conserve recherche avant tout, comme son nom l'indique, la « durée des produits qui doivent garder, dans toute la mesure du possible leur saveur et leur fraîcheur d'origine ». Le sel peut être utilisé pour obtenir ce résultat ; il agit dans ce cas par osmose, c'est à dire qu'il pénètre peu à peu à l'intérieur de l'aliment au fur et à mesure que celui-ci élimine l'eau qu'il contient. Mais, en même temps qu'il pénètre, le sel exerce un certain pouvoir inhibiteur vis à vis des micro-organismes qui seraient sans cela à l'origine de la décomposition de l'aliment considéré. Le sel se retrouve en moyenne à un taux de 2 % dans les conserves de légumes.

- *Utilisation dans l'industrie laitière (fromagerie et beurrerie industrielles) :*

La concentration moyenne en sel dans le fromage est de l'ordre de 1 à 2 %. Dans les fromages bleus et dans certains fromages de chèvre, elle peut atteindre 3 à 4 %. Dans le cycle de fabrication des fromages, l'opération du salage fait la transition entre l'égouttage et l'affinage. Ses effets sur les micro-organismes sont multiples :

- Protection contre les micro-organismes indésirables. Cette protection est d'autant plus nécessaire que le fromage est plus humide et c'est souvent le but le plus immédiat, afin de diriger l'envahissement de la surface des produits.
- Sélection de micro-organismes spécifiques.
- Influence sur l'activité des enzymes. Un excès de sel ralentit l'affinage, la pâte reste dure plus longtemps. En même temps, le salage conditionne l'affinage du fromage en permettant la sélection des souches microbiennes productrices d'enzymes utiles à la protéolyse et à la lipolyse du fromage (6).

En effet, la transformation du lait en fromage se fait sous l'influence de différents micro-organismes ou de produits sécrétés par des espèces vivantes. La coagulation du lait (fournissant le caillé) se fait sous l'action des bactéries lactiques et/ou d'enzymes du type de la présure. Jusqu'à l'affinage et la maturation (développement du goût et de la fleur du fromage), le sel sélectionne certains micro-organismes producteurs d'enzymes spécifiques indispensables à la protéolyse du caillé, autorise le développement d'espèces utiles telles que celles responsables de la pousse du bleu dans la masse de certains fromages ou celles formant la croûte fleurie en blanc des camemberts, ou la « flore du rouge » des munsters et des pont-l'évêque (16).

En ce qui concerne le beurre, la limite acceptable au goût, correspond à un taux de sel égal à 2 % du poids total du beurre, soit environ 11 % de la phase non grasse. Le salage permet d'inhiber partiellement le développement microbien, mais il ne protège pas le beurre contre les dégradations enzymatiques ou chimiques. De plus, une des qualités d'un beurre doux est sa texture, étroitement liée à la répartition de l'eau dans sa masse. Cette eau « légale » doit être finement dispersée dans la motte du beurre sous forme d'une multitude de gouttelettes microscopiques. Lorsqu'un beurre doux est destiné à être salé, il est indispensable d'utiliser, pour le salage, un sel de calibre le plus petit possible, afin de conserver la bonne texture initiale du beurre. La dose de sel correspond à des normes légales très variables suivant les pays. Le taux maximum est de 5 % en France pour le demi-sel et de 10 % pour le « beurre salé ». En fait, pour éviter un goût trop salé, on s'en tient généralement à une teneur en sel de 1.5 à 2 % du poids du beurre. A cette dose, qui représente 9 à 12 % de sel dans l'eau de beurre, le pouvoir antibactérien du sel est déjà net, mais il ne concerne que certaines espèces dont les ferments lactiques. Le salage présente aussi l'inconvénient d'abaisser la température de congélation de l'eau du beurre, donc de laisser plus longtemps de l'eau à l'état liquide à la disposition des micro-organismes halophiles et psychrophiles (16).

- *Utilisation en boulangerie, biscuiterie et biscotterie :*

Dans la fabrication du pain, le sel retarde la fermentation de la levure. Dans la pratique, le boulanger utilise une quantité de sel qui varie entre 1.5 et 2.25 % du poids de la farine. Dans les industries de biscotterie, biscuiterie, pâtisserie, le sel est utilisé en quantité moindre, en général moins de 1 %. Les pâtes sont en effet sucrées et le sel ne sert qu'à régler la fermentation et à soutenir le goût du sucre.

- *Utilisation du sel en pêche et en industrie de la pêche :*

Les poissons habituellement traités par salage sont : l'anchois, la sardine et la sardinelle, le thon et la bonite, le maquereau, la morue et le hareng, ainsi que certains œufs de poisson (caviar et succédanés). Le rôle du sel ici est double :

- D'abord il agit en tant qu'agent déshydratant de la chair du poisson, et, en enlevant l'eau de constitution, il entraîne l'inhibition de la flore psychrotrophe non halophile ;

- Ensuite, le sel coagule les albumines des matières azotées, ce qui a pour effet de « colmater » les cellules et ainsi de les mettre à l'abri du contact de l'air et des souillures possibles.

Pour pouvoir obtenir ce double effet dans de bonnes conditions, il convient de travailler avec une saumure saturée, faute de quoi on pourrait assister au phénomène inverse : la coagulation cesserait, le poisson se réhydraterait et les risques de putréfaction augmenteraient très rapidement.

Comme nous le verrons, de gros risques peuvent se présenter, en cas de non respect des règles de propreté et d'hygiène : il faut saler le poisson le plus frais et le plus propre possible (éviter les souillures au moment de l'éviscération ; il faut utiliser du sel propre, veiller à la concentration des saumures et à leur renouvellement ; il faut utiliser des eaux saines et potables (6). Le tableau V page 19 présente pour divers aliments les principaux agents dépresseurs utilisés et les activités de l'eau correspondantes.

Tableau V– Principaux agents dépresseurs et activités de l'eau approximative pour divers aliments . Selon Clement et Guilbert (d'après Guilbert (33)).

Aw1	Aliments	Solution de NaCl ou de saccharose (p/p)
0.98 – 0.94	Divers fromages ^{d, e} (fromage fondu, emmental, bleu, brie...); crème fraîche ^{f, g} ; lait concentré ^b ; pâtés de viandes ^{d, g} ; concentré de tomate	2 –9 % (NaCl) 15 – 49 % (saccharose)
0.94 – 0.90	Jambon de montagne ^{d, e, g} ; compotes de fruits ^a ; roquefort ^{d, e} ; pain; pruneaux ½ secs; jus de fruits concentrés ^{a, b, f} ; saucisson ^{d, (e), (f)} ; pâtes pâtisseries ^{a, (d)}	9 – 14 % (NaCl) 49 –59 % (saccharose)
0.90 – 0.86	Crème de marron ^a ; hareng suédois « salé-sucré » ^{a, d, e, f, g} ; salami ^{d, f} ; fromages secs ^{d, e} ; pâtes pâtisseries ^{a, d, c} ; confitures ^{a, b} ; beurre demi-sel ^d ; marinades, olives ^{d, f} ...	14 – 18.5 % (NaCl) 59 – 68 % (saccharose, solution saturée)
0.86 – 0.82	Lait concentré sucré ^{a, b} ; pâtisseries longue conservation ^{a, b, c} ; sirop d'érable ^{a, b} ; confitures ^{a, b}	18.5 – 21.5 % (NaCl)
0.82 – 0.74	Pâtes d'anchois ^{d, e} ; biscuits divers ^{a, c} ; poissons séchés salés ^{d, e, g}	21.5 – 26.5 (NaCl, solution saturée)
0.74 – 0.66	Parmesan ^{d, e} ; madeleine, cake ^{a, b, c} ; céréales, graines de légumineuse, farines...; saucisson sec ^{d, e, f} ; fruits séché ^{a, b} ; sirop de glucose ^b ; pâtes de fruits ^{a, b}	
0.66 – 0.58	Miel ^{b, a} ; pâtes de fruits ^{a, b} ; fruits séchés ^{a, b} ; pâtes alimentaires, confiseries ^{a, b}	
0.58 – 0.50	Confiseries ^{a, b} ; chocolat ^a	

Principaux agents dépresseurs de l'Aw : a : saccharose ; b : autres sucres ; c : sorbitol ou glycérol ; d : NaCl ; e : acides aminés ; f : acides « alimentaires » ; g : divers

b – Une volonté actuelle de diminuer la teneur en sel des aliments

Les ions sodium et chlorure constituent des éléments diététiques indispensables. Le sodium est le principal cation extracellulaire de l'organisme et le chlore le principal anion. Ensemble et avec d'autres solutés ces ions assurent le maintien du volume des liquides extracellulaires, de la pression osmotique, de la balance acido-basique ainsi que l'activité électrophysiologique des muscles et nerfs. Le sodium (ainsi que le potassium) intervient également dans les phénomènes de transport actif au travers des membranes cellulaires.

Bien que nécessaires, leur consommation en quantités excessives peut engendrer des problèmes de santé. Ceci est surtout vrai pour le sodium. En effet, de nombreuses publications ont mis en évidence la corrélation entre consommation de sel et crise cardiaque, cirrhose, syndrome néphrotique, asthme, cancer de l'estomac... Une relation a, en particulier, été établie entre consommation excessive de sel et hypertension.

La consommation moyenne de sel par habitant et par jour en Grande Bretagne a été estimée entre 8.2 et 9 grammes selon les sources (en incluant toutes les sources potentielles). Sachant que les 10 % de la population qui sont génétiquement sensibles au sel ne sont pas identifiables, les différentes autorités compétentes ont recommandé une limite maximale de 6 grammes par personne et par jour. Le problème est qu'il est difficile de mesurer précisément sa consommation en sel.

10% du sodium consommé serait naturellement présent dans la nourriture, 15% serait ajouté en cuisinant ou à table et 75 % serait incorporé durant la fabrication et le traitement des aliments. Il est donc évident que la diminution de la consommation en sel est sous tendue à des incorporation restreintes lors des fabrications.

Actuellement avec les avancées dans la réfrigération et les autres méthodes modernes de préservation des aliments, le sel voit son utilité restreinte sauf pour certains produits comme les viandes salées. C'est surtout un problème de goût qui se pose dans ce cas.

2 – Action du sel sur les aliments

a – Structure de l'eau dans l'aliment

La molécule d'eau est composée de deux atomes d'hydrogène et d'un atome d'oxygène : H_2O , qui sont très solidement unis (fig. 1 page 27).

Cette molécule n'est pas symétrique. De ce fait, des charges électriques négatives et positives existent à sa surface. D'une molécule à l'autre les charges de sens opposé s'attirent, celles de même sens se repoussent.

A 0 °C, les molécules se disposent en réseau cristallin : c'est la glace. Au-dessus de 0 °C et jusqu'à 100 °C, les molécules sont agitées mais restent rapprochées pour former un liquide. A 100 °C et au-dessus, l'agitation est telle que l'eau se transforme totalement en vapeur. Ce dernier phénomène est partiel pour les températures inférieures. A une température donnée, dans une enceinte close, contenant un peu d'eau pure, l'atmosphère se charge d'une quantité de vapeur déterminée, dite saturante : l'hygrométrie est de 100.

Si on ajoute du sel dans l'eau, la pression de vapeur saturante diminue et cela d'autant plus que la quantité de sel ajoutée est importante. Ce phénomène s'explique par le fait que l'eau est retenue, fixée par le sel. Elle est moins disponible. Le sel, dans l'eau, se sépare en deux ions très chargés de forces électrostatiques. Ils retiennent les molécules d'eau comme le ferait un aimant avec des billes d'acier (figure 2 page 27)

Le rapport entre la quantité de vapeur d'eau pour une concentration saline précise et la quantité de vapeur d'eau pure à la même température mesure l' A_w .

Dans un aliment, il n'y a pas que le sel qui possède des forces électrostatiques, il y a beaucoup d'autres composants qui ont la possibilité de fixer l'eau, les protéines par exemple. L' A_w dépend de l'ensemble (tableau VI) (68).

Tableau VI– A_w des aliments et microbes (68)

A_w	Aliments concernés	Microbes rencontrés
1.00	Eau pure	
0.99 – 0.95	Viande fraîche, poisson, lait, jaune d'œufs, crème, pâtisserie, fruits et légumes (macédoine), lait concentré, fromage frais, charcuteries, jambon blanc	<i>Pseudomonas</i> Clostridies, <i>Bacillus</i> Salmonelles, coliformes Production de toxines par les Staphylocoques
0.95 – 0.91	Fromages à pâte cuite, salami et bacons peu secs	Staphylocoques, <i>Cocci</i> Flore lactique
0.91 – 0.60	Lait concentré sucré, confiture, saucisson, jambons bien secs, viandes de grison, morue salée, fruits secs, farine, céréales, noix	Levures, Moisissures
< 0.60	Confiserie, biscuits secs, lait sec, poudre d'œuf, pâtes	

A la surface d'un aliment, l'eau disponible est fonction de l'aliment mais aussi de l'hygrométrie de l'air ambiant. Il y a des salles humides où se produisent des condensations, surtout sur les parois froides, et des endroits bien secs, ventilés dans lesquels les surfaces sont sèches. Les aliments non protégés se déshydratent dans de telles conditions.

Les aliments, au moment de leur production, ont des A_w élevées supérieures à 0.98 : viande, poisson, lait, légumes, fruits. Ils sont donc très fragiles. Depuis longtemps, des procédés (déshydratation, séchage, voire concentration) et chimiques (comme le salage) diminuant l' A_w sont connus et utilisés

Les soins à donner aux aliments varient donc en fonction de leur nature. Certains sont stables et sans aucun danger. D'autres sont des aliments à risque (68).

b – L'abaissement de l' A_w dans les aliments

b - 1 L'activité de l'eau dans les biosystèmes

Les biosystèmes solides (produits alimentaires solides d'origine végétale ou animale) sont constitués de cellules délimitées par des membranes semi-perméables et d'espaces microporeux et capillaires. En conséquence les solutés, dans la phase liquide

de ces aliments, ne se trouvent pas dans les conditions de solution idéales et on observera des évolutions de pression de vapeur d'eau et, donc, d' A_w différentes de celles prévues par la loi de Raoult. Lorsque l' A_w est élevée dans les cellules et capillaires, il peut y avoir une phase liquide où tout se passe comme si elle était sous pression = pression capillaire, pression osmotique. Les corrélations A_w – pression capillaire ou osmotique ne sont évidemment valables que dans l'hypothèse d'une phase liquide dans l'aliment, en équilibre thermodynamique dans le biosystème (71).

b - 1- 1 L' A_w et la pression capillaire

La pression de l'eau dans les capillaires diminue d'autant la pression partielle de vapeur d'eau que le diamètre du capillaire est plus faible. Environ 3 % de l'eau serait localisée dans des capillaires de diamètre inférieur à 0.1 micron, ce qui conduirait à des effets importants au-dessus d'une A_w de 0,9.

Dans un vaisseau capillaire l'eau est retenue en formant une surface libre concave et l'angle que forme l'horizontale avec la tangente au ménisque s'appelle angle de contact α (figure 7 page 30). L'abaissement de la pression partielle de vapeur d'eau au dessus de la surface libre de l'eau condensée dans les capillaires de la chair, entraîne un abaissement de l' A_w de l'ensemble du biosystème. La relation suivante a été établie :

$$A_w = - \exp [(2\Delta \cos\alpha \bar{V}) / (drRT)] = - \exp [(P_c \bar{V}) / RT] \quad (14)$$

dans laquelle :

Δ = tension superficielle de l'eau

α = angle de contact eau – paroi du capillaire

\bar{V} = volume molaire partiel de l'eau

r = rayon du capillaire (supposé cylindrique)

d = densité de l'eau ($d = 1$)

R & T = constantes des gaz parfaits et température

P_c = pression capillaire

b – 1 - 2 L' A_w et la pression osmotique

Lorsque deux liquides de concentrations moléculaires différentes sont séparés par une membrane semi-perméable, celle-ci laisse passer le solvant à l'exclusion des solutés. La pression osmotique est la différence de pression qui règne entre les deux liquides de chaque côtés de la membrane. S'il s'agit de solutions aqueuses, l'eau pure passe de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée pour rétablir l'équilibre. Les microbiologistes expriment parfois l'effet dépresseur de l' A_w dû aux solutés en terme de pression osmotique. La pression osmotique peut être reliée à l' A_w par l'équation suivante :

$$PO = (-RT / \bar{V}) \log_e A_w \quad (15)$$

Dans de telles solutions l' A_w diffère de ce que prévoit la loi de Raoult en raison de la dissociation de la molécule de soluté et des interactions entre molécules de soluté et de solvant. Pour les non électrolytes la différence peut être faible, mais pour les électrolytes la différence est toujours grande : elle augmente d'autant plus que le nombre d'ions engendrés par la dissociation de la molécule est grand.

Une faible variation de l'activité de l'eau entraîne une forte variation de la pression osmotique. Par exemple à 25° C, une variation de 10 % de l' A_w (0,99 à 0,9) conduit à une variation de la pression osmotique d'un facteur 10 (respectivement de $13 \cdot 10^5$ à $140 \cdot 10^5$ pascals)

Dans les aliments la situation est encore plus compliquée ; toute l'eau n'est pas libre d'agir comme solvant, une partie est liée à des groupes spécifiques insolubles. En outre certains solutés sont, eux aussi, liés à des constituants insolubles. C'est pourquoi la connaissance de la teneur en eau, de la nature et de la quantité de solutés présents ne fournit pas suffisamment d'éléments pour un calcul précis de l' A_w (71).

b - 2 La mesure de l'activité de l'eau

La connaissance de l' A_w est indispensable en technologie alimentaire afin de mieux maîtriser les réactions où l'eau intervient. Nous venons de voir que dans les solutions idéales il est relativement facile de déterminer l' A_w à partir des lois de Raoult. Dans les aliments présentant une phase liquide complexe et une phase solide, il n'est guère d'autre possibilité que de recourir à la détermination expérimentale.

Certaines méthodes dites indirectes et étalonnées consistent à mesurer une propriété caractéristique d'une autre phase absorbante, en équilibre avec le produit, et son atmosphère. Cela peut être des caractéristiques hydriques (équilibrages isopièstiques), électriques (hygrométrie à sonde capacitive ou résistive), mécaniques (hygromètre à cheveux). La précision des hygromètres peut être facilement estimée en utilisant une série de solutions saturées en sels inorganiques qui englobent des valeurs d' A_w à peu près constantes entre 0 et 30° C, pratiquement sur toute la gamme de 0 à 1. Les autres méthodes dites directes ou absolues consistent à mesurer, toujours sur de très faibles volumes d'air, d'une part la température sèche, d'autre part soit la température de rosée (méthode hygrométrique), soit la pression de vapeur d'eau (méthode manométrique), soit l'humidité spécifique (méthode gravimétrique), soit la température au thermomètre humide ou température de saturation adiabatique (psychrométrie). Seule la détermination du point de rosée et de la pression de vapeur sont adaptables aux mesures sur de faibles volumes d'air (71).

b - 3 Les isothermes de sorption de l'eau

b – 3 - 1 Définition

Si un aliment hygroscopique est en contact avec une atmosphère humide, il fixe de la vapeur d'eau jusqu'à l'équilibre avec l'air environnant : c'est l'adsorption. Si au contraire un aliment humide est placé en atmosphère relativement sèche, il cède de la vapeur d'eau jusqu'à l'équilibre, c'est la désorption. Dans les deux cas si, à température constante, les teneurs en eau et les A_w correspondantes sont mesurées à différents niveaux et reportées sur un graphique, on trace une courbe dite isotherme de sorption. Une isotherme de sorption indique donc, à l'équilibre et pour une température donnée, la quantité d'eau retenue par le produit en fonction de l'humidité relative de l'air dans lequel il est placé ou encore, la pression partielle de vapeur exercée par l'eau du produit en fonction de sa teneur en eau. La forme générale de ces isothermes de sorption est reproduite figure 3 page 28. On peut distinguer, de façon

schématique, une succession de trois états correspondant à des zones de valeur d' A_w bien définies A, B et C, caractérisées chacune par des propriétés chimiques, physiques et biologiques spécifiques. Ces zones représentent des régions dans lesquelles différents types de liaison de l'eau prédominent. Les isothermes de sorption sont très différentes les unes des autres selon la nature de l'aliment. Très théoriquement la figure 4 page 29 représente des isothermes de substances solubles (a = glucose) ou de substances contenant un élément soluble (b = jus de pomme) ou ne contenant que peu d'éléments solubles (c = fromage) ou enfin d'un produit peu hygroscopique (d = tarte).

Les isothermes de sorption se décalent lorsque la température varie, la couche de désorption est différente de la courbe d'adsorption. C'est le phénomène d'hystérésis.

b – 3 – 2 Interprétation des isothermes

La nature de l'eau des aliments correspondant aux trois zones des isothermes de sorption est différente de l'eau pure ; elle varie d'une zone à l'autre allant de l'eau liée à l'eau libre. Ces types d'eau, dotées chacune de propriétés spécifiques vont régir l'allure du traitement de salage et conditionner les durées de conservation.

- Les trois zones de l'isotherme de sorption

La plus grande partie de l'eau d'un aliment frais exerce une pression de vapeur très proche de celle de l'eau pure c'est à dire de l'unité. Cette valeur de la pression de vapeur est maintenue jusqu'à ce que la teneur en eau de l'aliment diminue aux environs des 22 g pour cent grammes de poids frais (28 % de la matière sèche MS) (figure 3 page 28). L'humidité n'est alors plus longtemps capable de maintenir la pression de vapeur de l'aliment vers l'unité ; aux valeurs inférieures à l'unité la pression va ensuite soit s'élever avec l'augmentation de l'humidité, soit s'abaisser avec la diminution de l'humidité. La caractéristique sigmoïde des isothermes de sorption résulte des modifications de l'humidité atmosphérique de cette dernière fraction (22 %) de l'eau dans les aliments déshydratés (figure 3) ; La plupart des chercheurs s'accordent pour délimiter trois sections ou régions différentes qui se succèdent sans solution de continuité.

Dans la première zone (figure 3, A) de l'isotherme comprise entre les $A_w = 0$ à 0,2 environ (la limite varie selon les produits alimentaires), l'eau se fixe en constituant la couche mononucléaire ou monocouche. Quand de l'eau est ajoutée à un aliment sec, les molécules sont adsorbées sur des sites hydrophiles (les groupes polaires des macromolécules telles que les protéines), jusqu'à ce que, au moins statistiquement, tous soient occupés. Ces groupes polaires créent à la microsurface de la molécule de protéine un champ de forces de nature électrostatique responsable de l'adsorption des molécules d'eau, en équilibre avec celles dont l'agitation thermique crée la pression de vapeur d'eau dans l'air environnant. La couche mononucléaire est donc constituée progressivement par des molécules (représentées schématiquement par des sphères dans la figure 5 page 29) qui peuvent saturer la surface disponible en occupant des positions à des distances minimales correspondant à leur sphère d'encombrement. Les molécules de vapeur sont fortement fixées par des liaisons hydrogènes de forte énergie et orientées spécifiquement comme dans un cristal de glace. L'état du fluide dans cette zone monomoléculaire est donc un état rigide, dans lequel les molécules ne se meuvent qu'à une très faible amplitude. Une forte pente de la courbe de sorption dans

cette zone traduit en général une forte concentration du substrat en sites hydrophiles (figure 4 page 29). C'est près du point d'achèvement de la monocouche et au-delà que les modifications de l'humidité ont l'influence la plus marquée sur l' A_w (figure 3). Inversement, des changements relativement importants de l' A_w de l'aliment sont nécessaires pour provoquer une évaporation ou une condensation appréciable de l'eau. Le modèle BET (annexe 1 page 99) permet d'évaluer la couche mononucléaire en termes de teneur en eau des aliments. Par exemple dans la chair de poisson elle représente de 3 à 6 g d'eau pour 100 g de matière sèche. Le même modèle permet d'évaluer l'énergie d'adsorption de cette couche ; elle est de l'ordre de 1 à 15 kcal / mole ce qui confirme la forte énergie signalée ci-dessus et les difficultés d'élimination de ce type d'eau.

La seconde zone de l'isotherme est quasiment linéaire (figure 3, B page 28) entre les deux courbes des zones A et C. Cette zone B comprise approximativement entre les valeurs d' A_w de 0,2 à 0,6 ou 0,7 selon les auteurs, correspond à une adsorption multimoléculaire c'est à dire à la fixation de plusieurs couches de molécules d'eau superposées aux précédentes auxquelles elles sont retenues par des liaisons hydrogène d'énergie plus faible que dans la zone A. Les énergies de liaison diminuent mais les molécules d'eau sont encore fortement orientées, leur mobilité est encore faible. Selon le modèle BET les couches multimoléculaires sont constamment présentes sur la phase solide mais ne concernent que partiellement la surface disponible (figure 6 page 30). Gomarín a mis au point une méthode utilisant la théorie mécano-quantique sous la forme d'une somme des états, qui permet de montrer la linéarité de l'isotherme dans la zone B et l'existence probable d'un état diffus des molécules liées sur une certaine épaisseur. Dans cette multicouche il y aurait un équilibre entre le nombre de molécules qui se dirigent vers la phase solide et le nombre de celles qui s'en écartent. L'état du fluide devient un état « pseudoliquide ».

Dans la troisième zone (figure 3, C) approximativement supérieure aux valeurs de A_w 0,65 la courbe ne correspond plus au modèle BET établi pour l'adsorption sur surface lisse. A l'échelle de la molécule d'eau, d'une part la surface est microporeuse (capillaires) et d'autre part, l'état liquide sous tension domine dans cette région ; l'épaisseur est suffisante pour que l'ordre statistique, caractérisant les molécules à l'état liquide puisse exister. En effet les molécules d'eau s'accumulent dans les capillaires de dimensions au moins égales à celles de la molécule d'eau. Il arrive un moment où ces molécules s'associent pour former un état liquide soumis aux lois générales de la tension superficielle dont l'interface avec l'air forme un ménisque (figure 7 page 30) ; Cette phase liquide obéit aux lois de la capillarité. On voit sur la figure 7 que le rayon du ménisque concave augmente à mesure que le capillaire se remplit d'eau et, d'après l'équation 14 page 22, l' A_w augmente lorsque le rayon augmente, l' A_w diminue lorsque la tension superficielle augmente : l'angle de contact α est plus grand, le ménisque plus concave c'est le phénomène de « mouillage » qui jouera un rôle dans l'hystérésis des courbes de sorption. D'autre part, dans la zone C, la phase liquide dissout des constituants de faible poids moléculaire et s'il y a des membranes, des phénomènes osmotiques apparaissent. Les trois effets conjugués : adsorption, pression capillaire, pression osmotique expliquent pourquoi la courbe ne répond plus au modèle BET et est asymptote à la verticale $A_w = 1$ (figure 3 page 28).

- Propriétés de l'eau dans les trois zones

Les propriétés de l'eau dans les trois zones sont différentes de l'eau pure et différentes entre elles. L'eau de la couche mononucléaire n'est pas congelable, trop fortement liée pour cristalliser ; l'eau serait alors formée d'une fraction sans effet calorique et d'une fraction incorporée dans une phase vitreuse amorphe. De même l'eau de cette couche n'est pas disponible en tant que solvant ou que réactif. En effet l'aptitude de l'eau à dissoudre des solutés est très diminuée, voire disparaît complètement quand elle est adsorbée. Cette aptitude à dissoudre les composés simples dépend essentiellement de la nature de ceux-ci, c'est pourquoi la proportion d'eau ayant perdu sa faculté de solvant ne peut être définie que par rapport à un soluté donné. La notion de « point de mobilisation de l'eau » est intéressante pour l'étude des réactions de dégradation lors de la conservation. Ce point correspond à la teneur en eau à partir de laquelle l'eau de la phase liquide commence à agir comme solvant d'un soluté défini. Sur la courbe de sorption BET, il se situe à la fin de la section linéaire de la courbe (figure 8 page 30) dit « point critique ». Si l'on prolonge arbitrairement la partie linéaire de la courbe (figure 8) on peut mettre en évidence une partie hachurée correspondant à « l'eau dite biologique » (nécessaire aux manifestations chimiques puis biologiques de la vie). Dans cet espace on distingue :

* La zone située entre la courbe de sorption et la droite extrapolée (E-F figure 8) où les propriétés solvantes sont telles vis à vis de certains solutés qu'elle a été appelée eau « solvante »

* La zone comprise entre la droite extrapolée et l'abscisse (D-E figure 8) où l'eau n'a pas de propriétés solvante. L'ordonnée, à l'intersection de la droite avec la verticale $A_w = 1$ (G figure 8), est la quantité maximum d'eau solvante que le produit peut fixer.

Dans la troisième zone de l'isotherme de sorption, les molécules d'eau sont donc suffisamment mobiles pour participer aux réactions biochimiques et être disponibles comme solvant. La chaleur de sorption est quasi nulle puisque les énergies de liaison de l'eau sont faibles à nulles, à mesure que l' A_w se rapproche de 1 (71).

Figure 1 - La molécule d'eau.

D'après Rozier J. (68)

Figure 2 - Arrangement particulier des molécules d'eau autour des ions chlorure et sodium.

D'après Rozier J. (68)

Figure 3 - Courbe générale représentant l'isotherme de sorbtion d'un aliment.

Zone A : monocouche. Molécules d'eau fortement liées et orientées. L'état du fluide est rigide.

Zone B : zone d'adsorption multimoléculaire. Molécules d'eau encore fortement liées et orientées. Etat « pseudo-liquide ».

Zone C : état liquide

NOTA – Dans toutes les figures suivantes, les sigles ont les significations suivantes :

H % MS: g d'eau %g de matière sèche délipidée

H % F : g d'eau %g de poids frais

HR : humidité relative

HRE : humidité relative d'équilibre

D'après Duckworth (Sainclivier (71))

Figure 4 - Courbes de sorption

- a) d'un corps soluble (glucose)
 - b) d'une substance contenant des corps solubles (jus de pommes)
 - c) d'une substance contenant peu de corps solubles (fromage)
 - d) d'une substance peu hygroscopique (tarte)
- D'après Bimbenet J.J. (sainclivier (71))

Figure 5 - Représentation schématique de la couche monomoléculaire dans la zone A de l'isotherme de sorption
d'après Gomarín C. (Sainclivier (71))

Figure 6 - Représentation schématique de la couche multimoléculaire dans la zone B de l'isotherme de sorption
D'après Gomarín C. (Sainclivier (71))

Figure 7 - Représentation schématique de l'eau sous tension dans les capillaires de la zone C de l'isotherme de sorption.

D'après Gomarín C. et Multon J.L.(Sainclivier (71))

Figure 8 - Eau solvante mesurée sur la courbe de sorption
D'après Multon J.L (Sainclivier (71))

c – Action propre du sel sur les aliments : exemple du poisson

c – 1 Action physico chimique

Les tissus constituant la chair de poisson sont formés d'un ensemble de cellules dont les parois se comportent comme des membranes semi-perméables. A première vue le processus de salage peut donc être décrit comme une simple osmose à travers ces membranes. Au contact du poisson, le sel sec et ses impuretés ou la saumure (dans le cas du salage en saumure) diffusent en exerçant une pression osmotique proportionnelle au coefficient de diffusion et à la concentration en ions qu'ils peuvent fournir. Pour réduire ce gradient, l'eau du poisson exsude vers la saumure jusqu'à l'équilibre des concentrations salines de part et d'autre. Ces échanges entre fluide intracellulaire et milieu extérieur (sel sec ou saumure) sont rapides au début puis ralentissent exponentiellement jusqu'à l'équilibre (71).

En fait les choses sont un peu plus complexes :

- La face externe est constamment en présence de solution saturée et ne permet l'équilibre qu'après une exsudation maximale de la phase aqueuse des tissus.
- En second lieu le liquide cellulaire contient des colloïdes dans lequel l'eau n'est pas à l'état libre et la membrane s'oppose au passage de ces colloïdes.
- Enfin les membranes ne sont pas des supports inertes, et elles ne sont pas rigoureusement semi-perméables.

Pratiquement la phase de latence qui existe dans le salage à sec (temps pendant lequel se constitue la saumure saturée) n'existe pas dans le cas du salage en saumure saturée ; en outre, dans ce dernier cas, les impuretés jouent un rôle bien moindre que dans le salage à sec. Avec les saumures faibles l'allure des échanges osmotiques est encore différente et les produits finis sont moins déshydratés.

Pendant le début du salage, l'eau liée aux protéines ne peut pas prendre part à ce mécanisme d'échange. Tant que la teneur en sel est entre 2 et 5 % l'eau reste liée aux protéines qui gonflent, c'est la « turgescence ». A cette faible concentration la turgescence est due à l'adsorption d'ions (probablement les ions Cl^-) à la surface des chaînes de protéines, augmentant ainsi le nombre de charges négatives et, en conséquence, provoquant une augmentation des forces de répulsion à l'intérieur et entre les chaînes et, dans l'espace créé, une augmentation de l'eau d'hydratation des protéines puisqu'une quantité d'eau supplémentaire est nécessaire pour hydrater les nouvelles charges négatives. A mesure que la concentration augmente dans les chairs, les protéines myofibrillaires deviennent peu à peu solubles jusqu'à un maximum de solubilité qui se situe entre 3 et 12 % selon la température et l'espèce du poisson. Puis, la concentration en sel continuant d'augmenter (au-delà de 12 % par exemple pour la morue), des protéines précipitent dans les tissus (coagulation des albumines notamment). Si le taux de salinité venait à diminuer pour une cause quelconque (défaut de recharge d'une saumure de salage par exemple), on peut observer une réversibilité de cette coagulation. L'emploi de sel pur favorise cette réversibilité alors que les impuretés (sels de Ca et de Mg) tendraient à l'empêcher. Cette observation conforte le conseil donné de ne pas employer du sel absolument pur. Aux concentrations en sel voisines de la saturation, la quasi-totalité des protéines précipitent. En effet, les ions Na^+ et Cl^- et les protéines musculaires ont une forte

affinité pour l'eau ; à forte concentration saline, cependant, ces ions entrent en concurrence avec les molécules de protéines pour la relativement faible quantité d'eau présente, et comme ils attirent généralement les molécules d'eau plus fortement que les protéines, celles-ci déshydratent ; Ce sont des protéines dénaturées. On dit vulgairement que la faible teneur en eau du poisson fortement salé est due à la dénaturation des protéines. Lorsque la teneur en sel se situe entre 15 et 20 %, l'eau liée des molécules de protéines retourne à l'état libre, si bien que la phase aqueuse des tissus se dilue, la concentration en sel de la chair diminue et provoque une nouvelle migration du sel extérieur vers le poisson.

En sens inverse la migration de l'eau venant du poisson vers l'extérieur s'effectue sous l'influence de la diffusion osmotique. Les filets de poisson accusent alors une perte de poids. A mesure que le front salé pénètre dans la chair, le taux de diffusion se ralentit progressivement jusqu'à l'équilibre. Pendant les phases finales du salage, le poisson tend à réadsorber un peu de la saumure et à reprendre un peu de poids. Cette observation nous amène à approfondir ce qui se passe au niveau de la capacité de rétention d'eau de la chair de poisson au cours du salage et d'en examiner les conséquences.

c – 2 Action sur la capacité de rétention d'eau

Lorsque la concentration du sel dans les cellules de la couche superficielle de la chair atteint son maximum, le front salin migre graduellement vers les couches internes. Que se passe-t-il au niveau de la cellule musculaire ?

La contraction musculaire est un rapprochement des filaments d'actine et de myosine conduisant à l'actomyosine plus compacte et, par conséquent, à un espace restreint entre deux stries Z consécutives, d'où une diminution du volume libre permettant de retenir l'eau c'est à dire une diminution de la capacité de rétention d'eau (CRE). Au point isoélectrique de ces protéines (pHi) (figure 9,a,0 page 35) le nombre de charges négatives et positives est identique, ces charges s'attirent, l'espace entre les myofilaments est restreint, l'hydratation est à son minimum.

Or, de part et d'autre du pHi, le nombre de charges positives (gamme des pH acides) ou de charges négatives (gamme des pH basiques) croît augmentant ainsi les forces de répulsion intra et inter chaînes ; l'espace entre les filaments s'agrandit permettant l'admission de molécules d'eau : la CRE augmente (figure 9,a, 2+ et 2-). Rappelons que le pHi de l'actomyosine se situe vers 5 – 5.1 et que l'évolution de la CRE d'un broyat de chair (exprimé en % d'eau liée) en fonction du pH met bien en évidence un minimum au pHi et une valeur supérieure progressive de part et d'autre de ce pHi (figure 10 page 35). Si l'on ajoute un sel neutre (cas du sel de salage) l'effet obtenu dépend exclusivement de la charge de la protéine. Dans la zone à pH inférieur au pHi où il existait un excès de charges positives (figure 9, a, 1+ et 2+) l'anion en se fixant sur un certain nombre de charges positives, a déplacé l'équilibre vers le pH 4 (figure 9, b, 0) ; le nouveau pH est de 4 au lieu de 5 – 5.1 (figure 11 page 35). A ce stade, en comparant avec le même pH sans sel (figure 9, a, 1+ et figure 9), on voit que dans la chair salée, la répulsion entre filaments est moindre et la CRE diminuée. Dans la zone à pH supérieur au pHi avant salage, il existait un excès de charges négatives (figure 9, a, 1- et 2- page 35), l'anion du sel ajouté annule quelques charges positives et, de ce fait, augmente encore plus le nombre relatif de charges négatives, donc

augmente l'effet répulsif, l'espace entre les filaments (figure 9, b, 2- et 3-) et augmente la CRE (figure 11). Mais cette augmentation ne se produit que jusqu'à un maximum au-delà duquel la CRE diminue à nouveau : les ions du sel neutre attirent les molécules d'eau et déshydratent la molécule protéique. Il peut y avoir ainsi modification de la structure des protéines. Les extrémités terminales des molécules protéiques déterminent le treillis structural du sarcolème, des myofibrilles et myoseptes. L'effet électrostatique est augmenté par la disparition des molécules d'eau ; il est concevable que les molécules d'eau, situées aux jonctions des molécules de protéines, disparaissent complètement d'où rétraction des tissus.

Ces échanges entre l'eau et la saumure extérieure conduisent donc, lorsque l'équilibre est atteint, à des volumes du poisson différents selon la concentration en sel de la saumure. On observe que :

- La teneur en sel de la chair, exprimée en poids de sel / poids de matière sèche dessalée (S / MSD), augmente en fonction de la concentration en saumure et tend vers une asymptote aux concentrations élevées (figure 12 page 36).
- La teneur en eau du muscle salé, exprimé en poids d'eau / poids de matière sèche dessalée (E / MSD), augmente d'abord (surtout à 37 °C) en fonction de la concentration en sel de la saumure, jusqu'à un maximum pour diminuer ensuite et être faible aux concentrations élevées (figure 13 page 36).
- L'importance du volume du muscle salé, exprimé en cm³ / poids en gramme de matière sèche dessalée (V / MSD), en fonction de la concentration, suit la même évolution que la teneur en eau (figure 14 page 36).

Il y aurait donc bien une corrélation entre la CRE et l'importance du volume du poisson en fonction de la teneur en sel de la saumure. Parallèlement, il y en a une aussi entre teneur en eau des tissus et dureté de la chair (71).

3 – Sel et conservation des aliments déshydratés

L'un des intérêts des isothermes de sorption réside en leur utilisation dans le calcul des valeurs critiques d'humidité compatibles avec la plus longue conservation possible d'un aliment donné dans des conditions définies sans qu'il y ait d'altérations. C'est la détermination de la teneur optimum en eau (Mo). Il existe une relation linéaire entre cette « humidité optimum de conservation » et l'activité de l'eau pour un certain nombre d'aliments non sucrés. Cette relation est définie par l'équation :

$$Aw = 0.784 - 0.0693 Mo \quad (16)$$

C'est une droite de régression représentée figure 15 page 37. Nous venons de voir que dans la zone C de l'isotherme de sorption, la chaleur de sorption est minime vers les valeurs d'Aw = 0.80 (figure 8 page 30). La valeur d'Aw 0.784 calculée par Caurie (d'après Sainclivier (71)), correspond à l'humidité optimum de conservation Mo de la plupart des aliments déshydratés, est approximativement en accord avec cette Aw de 0.80, en ce qui concerne la chaleur de sorption nulle à ce niveau (Mo est nulle à 0.784). D'après Sainclivier (71), Labuza a établi que pour la plupart des aliments déshydratés (non sucrés) Mo atteint 11.3 % pour Aw = 0. Or 11.3 est très proche aussi

du nombre de kcal/mole représentant l'énergie maximum de liaison covalente de l'eau (énergie correspondant au passage d'une molécule d'eau de l'état fixé à l'état libre par rupture de liaison eau-substrat, ou l'inverse). C'est ce qui a fait suggérer, dans les limites 0 – 11.3 de Mo , l'équivalence numérique entre l'humidité optimum Mo et l'énergie de sorption Q_s . La relation $A_w - Q_s$ est linéaire et identique à la relation $A_w - Mo$ et d'après l'équation (16) on a :

$$A_w = 0.784 - 0.0693 Q_s \quad (17)$$

$$Q_s = 11.313 - (A_w / 0.0693) \quad (18)$$

Si on place la droite de régression (figure 16, AB page 37) $A_w = f(Q_s)$ ou $A_w = f(Mo)$ sur la tracé d'une isotherme de sorption, elle partage celle-ci en une zone (1) de $A_w = 0$ à 0.784 où l'eau est plus ou moins disponible (elle correspond approximativement mais pas exactement aux zones A + B de la figure 3 page 28) et une zone (2) de $A_w > 0.784$ où l'eau est pratiquement disponible (figure 16 page 37). Pour un point quelconque de la droite de régression AB le rapport $Q / Mo = 1$. Cela signifie qu'avec la plupart des aliments (non sucrés) présentant des isothermes différentes les unes des autres, les points d'intersection droite de régression – isotherme (tels que S_0, S_1, S_2 figure 16) désignent l'humidité minimum assurant un optimum de conservation sans craindre d'altérations et ce quel que soit l'aliment considéré (non sucré), bien que ces humidités et A_w soient différentes selon la nature des constituants. On dit aussi que ces points sont les humidités critiques au-dessus et en dessous desquelles il y a détérioration de l'aliment. Cette humidité critique sur une isotherme donnée (S_0 , figure 16) est légèrement plus élevée mais toute proche de celle correspondant à la couche monomoléculaire de l'isotherme BET (annexe 1 page 99). (point M figure 16)

Cette humidité est également désignée « humidité de sécurité ». Ainsi l'humidité de sécurité du saumon surgelé est plus élevée que l'humidité de la couche monomoléculaire BET, ce qui permet d'obtenir un produit plus stable. Une relation existe bien entendu entre la nature de l'eau adsorbée et les différentes zones de l'isotherme de Caurie : à partir de l'humidité de sécurité (S figure 17 page 37) l'énergie de l'eau adsorbée diminue à mesure que l'humidité totale augmente. L'adsorption initiale se ferait exclusivement à partir d'eau à l'état gazeux (figure 17, zone A1) jusqu'à saturation vers S où les molécules gazeuses commencent à se condenser aux sites d'adsorption avec augmentation de l' A_w . Dès que la condensation commence, l'énergie de liaison diminue et on peut dire que la droite AB, aux valeurs d' A_w supérieures à S, indique la proportion : eau fixée à l'état gazeux – eau de condensation partiellement fixée à l'état liquide dans l'aliment pour une température et une A_w donnée. L'humidité de l'aliment devient un mélange d'eaux fixées à l'état gazeux et à l'état condensé, la proportion de la première diminuant quand la seconde augmente à mesure que l' A_w augmente (figure 17, zone AII). A une valeur de 0.784 il n'y a plus de phase gaz de l'eau, la totalité de l'eau sorbée est liquide (condensée), libre, mobile. Cette zone (figure 17, zone AIII) est approximativement la même que la zone C de l'isotherme BET.

Figure 9 - a) Influence du pH sur les charges protéiques
b) Influence du pH sur les charges protéiques en milieu salé
D'après Hamm R. (Sainclivier (71))

Figure 10 - Influence du pH sur la capacité de rétention d'eau d'un broyat de chair
D'après Hamm R. (Sainclivier (71))

Figure 11 - Influence du sel sur la capacité de rétention d'eau d'un broyat à différents pH
D'après Hamm R. (Sainclivier (71))

Figure 12 - Teneur en sel du muscle à l'équilibre en fonction de la concentration de la saumure à différentes températures.

D'après Del Valle G.M. *et al* (Sainclivier (71))

Figure 13 - Teneur en eau du muscle à l'équilibre en fonction de la concentration de la saumure à différentes températures.

D'après Del Valle G. M. *et al* (Sainclivier (71))

Figure 14 - Volume du muscle à l'équilibre en fonction de la concentration de la saumure à différentes températures.

D'après Del Valle G.M. *et al*. (Sainclivier (71))

Figure 15 - Relation entre l'humidité optimale de conservation M_o d'aliments déshydratés et l'activité de l'eau A_w

M_o = Humidité optimum de conservation en H % MS ou énergie desorption Q_s en kcal / mole
D'après Caurie M. (Sainclivier (71))

Figure 16 – Relation entre A_w , teneur en eau M_o , des aliments et l'énergie de sorption Q_s

M_o en H % MS ; Q_s en kcal
D'après Caurie M. (Sainclivier (71))

Figure 17 – Diagramme des différents états de l'eau en relation avec l'isotherme de sorption

D'après Caurie M. (Sainclivier (71))

B – LE SEL SELECTIONNE LES MICRO-ORGANISMES

Les micro-organismes ont un besoin absolu d'eau pour leur croissance, bien que ces besoins soient extrêmement différents selon les espèces. A mesure que l' A_w s'abaisse, le métabolisme microbien est de plus en plus inhibé jusqu'à ce que la croissance soit stoppée. Aux valeurs de $A_w < 0,60$, toute multiplication de micro-organisme est arrêtée. Ce sont les microbiologistes qui furent les premiers à rechercher un terme significatif pour décrire la relation entre la vie microbienne et les conditions d'humidité du milieu environnant. C'est Mossel *et al.* (d'après Sainclivier (71)) qui spécifient que l'humidité relative de l'atmosphère en espace clos au-dessus d'un aliment est en bonne corrélation avec le taux de croissance des bactéries et c'est Scott (d'après Sainclivier (71)) qui introduit la notion d'activité de l'eau en relation avec la vie microbienne. Chaque espèce a une A_w optimum de croissance. On voit dans le tableau VII page 41 et la figure 18 page 42 que celui des bactéries est plus élevé que celui des levures et encore plus que celui des moisissures, celles-ci étant les moins exigeantes à l'exception des levures osmophiles. Généralement une A_w élevée au-dessus du minimum permet une meilleure croissance mais se serait alors oublier la dépendance sous laquelle se trouvent les micro-organismes vis à vis de la pression osmotique dans les échanges intermembranaires. Certains d'entre eux prolifèrent mieux à des valeurs de pression osmotique élevée ou dans des milieux à forte concentration ionique : ce sont les halophiles (croissance en présence de sel), les osmophiles (croissance à pression osmotique élevée), les xérophiles (croissance dans les milieux secs). Ces micro-organismes ne se multiplient pas à des A_w proches de l'unité. En outre, on a remarqué qu'une A_w plus élevée était nécessaire pour la croissance sur aliment solide que sur aliment liquide, sans doute à cause des problèmes de diffusion des nutriments. La plupart des aliments hébergent une flore dont la composition est conditionnée, en outre, par l'activité de l'eau. Les altérations observées sont le reflet de cette écologie.

L'activité de l'eau influence chacune des quatre phases de croissance des micro-organismes par son action sur le temps de germination des spores ou sur la longueur de la phase de latence végétative, sur le taux de croissance de la phase logarithmique, sur la durée de la période à taux de croissance stationnaire et sur le taux de mortalité (figure 23 page 44). Le critère le plus important, généralement retenu, est la détermination de l' A_w minimum permettant la croissance. Cependant, si on ne considère que l'aspect technologique de la conservation, d'autres critères peuvent être intéressants tels que : A_w de production d'une toxine d'un pathogène, A_w d'inhibition de sporulation et de germination des spores.

1 – Relations A_w – réactions enzymatiques

Il est probable que l'activité de l'eau intervienne sur les deux stades de la réaction enzymatique : liaison enzyme/substrat et scission du complexe résultant. La principale fonction de l'eau est d'augmenter la mobilité des substrats ; en conséquence l'activité enzymatique et la stabilité des enzymes varient dans le même sens que l'isotherme de sorption (figure 19 page 42).

Si l'action bactérienne cesse très vite avec l'abaissement de l' A_w , les réactions enzymatiques, elles, se poursuivent bien en deçà. L'eau agit surtout en tant que solvant des réactants facilitant ainsi la première phase de contact enzyme/substrat. Cependant,

la nécessité de molécules d'eau n'est pas toujours le facteur limitant. Quoiqu'il en soit des exceptions, on pourrait dire d'une manière générale que puisqu'aux valeurs d' A_w de la monocouche et en dessous il n'y a pas d'eau disponible pour les réactions enzymatiques, celles-ci tendront vers zéro dans la zone A de l'isotherme de sorption (fig.20 page 43). On notera la différence de figuration de l'activité enzymatique globale en fonction de l' A_w : elle cesse à $A_w = 0.2$ sur la figure 19 (selon Labuza puis Rockland -d'après Sainclivier (71)-) mais non sur la figure 20 (selon Troller -d'après Sainclivier (71)-), ce qui illustre bien que l'on ne peut guère généraliser. A mesure que l'eau est éliminée, un certain nombre d'autres facteurs interviennent qui tendent soit à promouvoir, ou le plus souvent et d'une manière plus intense, à restreindre l'action enzymatique. Ce sont entre autres : le pH, la force ionique, et surtout la concentration des solutés (et parmi ceux-ci il y a aussi bien des activateurs que des inhibiteurs de l'action enzymatique) (71).

L'un des points les plus important est d'envisager l'effet du manque d'eau sur l'enzyme considérée comme protéine. Lorsqu'une enzyme perd son activité à faible A_w c'est en raison de la dénaturation (association- dissociation des sous-unités) de la structure quaternaire et de la structure tertiaire. Cette dernière est due, en partie, à une réorganisation d'une structure de l'eau autour de la molécule d'enzyme et spécialement aux sites actifs de l'enzyme. Aux très faibles A_w la structure secondaire elle-même est atteinte.

Lorsque l' A_w s'élève, les condensations dans les capillaires commencent et le taux d'activité enzymatique augmente, ne serait-ce qu'en raison des facilités de contact enzyme-substrat.

Certains additifs tels que le chlorure de sodium, en réduisant l' A_w « déplacent » effectivement l'eau, et ce faisant, augmentent la stabilité des enzymes présentes. Celles-ci conservent normalement leur activité assez longtemps si l'aliment salé est maintenu à un pH proche de la neutralité, à de basses températures et à humidité réduite. Les techniques ancestrales de salage et de maturation du poisson en baril ne sont pas autre chose, une $A_w < 0.3$ empêche l'activité microbienne tout en préservant l'activité enzymatique naturelle du poisson. Il en est de même pour la papaïne, enzyme largement utilisée pour les hydrolysats de poisson, qui est stabilisée par addition de sel ; les extraits de papaïne en solution saline auraient une A_w de l'ordre de 0.6 et seraient actifs dans les biosystèmes contenant de relativement faibles quantités d'eau.

Par contre certaines protéases (mais surtout les protéases fongiques) sont inhibées par 2.1 à 3 % de sel mais il n'est pas certain que cette inhibition soit due à l'abaissement de l' A_w .

Dans des biosystèmes modélisés on a étudié l'activité de deux oxydases : la peroxydase et la lipoxygénase en fonction de l'humidité relative (figure 21 page 43). On voit que l'activité de la lipoxydase cesse à $A_w = 0.23$ mais qu'aux valeurs plus élevées l'activité progresse jusqu'à un maximum vers $A_w = 0.85$ et se maintient au-delà. Au contraire, la peroxydase commence une certaine activité à des valeurs d' A_w très basses pour progresser ensuite plus lentement que la lipoxygénase et passer par optimum vers $A_w = 0.85$ et voir son activité diminuer à des valeurs d' $A_w > 0.85$ (71).

2 – Relation Aw – croissance microbienne

a - Sur la croissance des bactéries

En général le taux de croissance est plus faible à mesure que l'Aw s'abaisse et que cette action de l'Aw peut jouer à n'importe quel stade de la croissance bactérienne. La mort de la cellule en est rarement la conséquence mais seulement un retard de croissance et un ralentissement de la vitesse de croissance. Parallèlement le métabolisme bactérien est très ralenti. La morphologie peut, elle-même, être modifiée par exemple entre $0,997 > Aw > 0,9$ pour *Staphylococcus aureus*. De même des cellules de *Salmonella typhimurium* se rétrécissent et se contractent puis plasmolysent si l'abaissement de l'Aw s'accompagne d'un stress osmotique. Les germes Gram négatif (*E. coli* par ex.) s'allongent en filaments.

La plupart des bactéries non halophiles ont un taux de croissance maximum aux environs d'Aw = 0.980 à 0.997 (0.995 – 0.980 d'après (2)) ; Ensuite il diminue linéairement. Ce déclin est important pour les bactéries dont les exigences en eau sont élevées et, faibles pour celles capables de se contenter de dessiccation poussée. Très souvent aux valeurs d'Aw donnant un taux de croissance maximum, correspond à une phase de latence courte ; au contraire aux valeurs d'Aw ne permettant qu'une faible croissance, la phase de latence est longue. Les relations Aw – phase de latence sont d'ailleurs très variables selon les espèces. On n'a que peu de données sur l'influence de l'Aw sur la phase stationnaire alors que des informations utilisables existent sur les Aw minimales permettant la croissance bactérienne (figure 22 et 23 pages 43 et 44). En général les germes Gram négatif sont plus sensibles à une réduction de l'Aw (croissance minimum 0.94-0.96) (71).

Le métabolisme bactérien rejette de l'eau dans le milieu environnant, provoquant ainsi une élévation locale de l'Aw, favorable à d'autres micro-organismes moins xérotolérants C'est ainsi que le poisson salé – séché contaminé est d'abord attaqué par des moisissures, souvent sur la queue, partie la plus sèche. Puis la moisissure s'étend, humidifie la surface permettant aux bactéries halophiles de proliférer et de putréfier le poisson.

Les bactéries halophiles, présentent des relations différentes avec l'eau ; elles prolifèrent aux basses valeurs d'Aw ; elles ont des exigences spécifiques en ions sodium (10 à 15 % de NaCl). Elles peuvent encore proliférer à Aw = 0.75. Ces basses valeurs, non seulement leur conviennent, mais les halophiles sont incapables de se multiplier à des valeurs élevées de Aw (ce sont des osmophiles). Lorsque la présence de NaCl leur est indispensable, on les appelle des halophiles strictes (ou obligatoires). *Halobacterium salinarium* exige une concentration minimum de 3 M NaCl (Aw = 0.88) pour permettre sa croissance et l'on ne peut pas en remplacer plus de la moitié par du KCl. Les halophiles modérées exigent 0.2 M (Aw = 0.99) à 0.5 M NaCl (Aw = 0.98) pour leur croissance qui est optimale vers 1 M NaCl (Aw = 0.95). Elles pourraient même tolérer des concentrations proches de celles exigées par les halophiles strictes. Par contre on pourrait remplacer 80 à 90 % du sel par du KCl.

Les bactéries pathogènes appartiennent aussi bien au groupe des non halophiles qu'à celui des halophiles. C'est ainsi que les Salmonelles et les *Clostridium* ont leur optimum de croissance vers Aw = 0.995 pour cesser vers 0.96 alors que *Staphylococcus aureus* est osmotolérant et, si son optimum de croissance se situe aussi

vers 0.995, il peut proliférer jusqu'à des valeurs de 0.86 ; le *Vibrio parahemolyticus* est un halophile obligatoire, il exige environ 2 % de NaCl pour une croissance optimum et son taux de croissance minimum est observé pour $A_w = 0.948$.

Staphylococcus aureus survit dans les saumures. Les courbes de croissances typiques à différentes A_w sur des milieux synthétiques sont reproduites figure 25 et sur de la chair de crevette figures 26 et 27 page 45. selon Scott (d'après Sainclivier (71)) à 29° C, ce germe se développe bien entre $0.86 < A_w < 0.88$, alors qu'il peut se multiplier dans des milieux titrant de 16 g à 375 g d'eau pour 100 g de matière sèche (13.8 à 79 % poids frais) ; c'est donc bien l' A_w le facteur limitant et non la teneur en eau.

Le minimum permettant la croissance des *Salmonella* se situe pour certaines espèces vers 0.93 – 0.94, le maximum vers 0.995 et une diminution significative du taux de croissance s'observe déjà pour des activités de l'eau de 0.996 et 0.999 de chaque côté de l'optimum de 0.995 (figure 28 page 45).

Clostridium perfringens a une des croissances les plus rapides connues avec un temps de génération de 10 à 11 minutes à l' A_w optimum 0.995 mais, en présence de sel, à la même A_w , le temps de génération descend déjà à 43 minutes. Il n'y a plus de croissance en deçà de 0.95. Malgré une certaine sensibilité au sel il peut survivre (mais non se multiplier) dans des salaisons faites avec des saumures à 3 M NaCl (17.6 % environ).

Clostridium botulinum type E aurait lui aussi un optimum vers une A_w de 0.995. En milieu salin, il n'y a plus de croissance à $A_w = 0.965$ et la durée de la phase de latence est doublée ou triplée. Les souches type E sont beaucoup sensibles à l'abaissement de l' A_w que les types A et B (71).

Tableau VII – Activité minimum de l'eau permettant la croissance des micro-organismes.

D'après Cheftel J.C, Hsu W.H., Matz S.A., Scoot W.J., Troller J.A., Pary T.J. *et al* (Sainclivier (71)).

	Definition des	A_w
Bactéries	Banales	1.00 – 0.90
	Halophiles	0.90 – 0.75
Levures	Banales	0.95 – 0.88 – 0.85
	Osmophiles	0.85 – 0.60
Moisissures	Banales	0.95 – 0.80
	xérophiles	0.85 – 0.65

Figure 18 - Croissance des micro-organismes en fonction de l'activité de l'eau.
D'après Parry J.T. et Pawsey R.K. (Sainclivier (71))

Figure 19 - Représentation schématique de l'isotherme de stabilité intégrant les taux d'altérations chimiques, enzymatiques et microbiologiques, en fonction de l'activité de l'eau.
D'après Labuza T.P. (Sainclivier (71))

Figure 20 - Relation entre isotherme de sorption et activité enzymatique.
D'après Troller J.A. (Sainclivier (71))

Figure 21 - Relation HR-vitesse de réaction de la peroxydase (▼) et de la lipoxydase (■)
D'après Blaine (Sainclivier (71))

Figure 22 – Relation entre activité de l'eau et croissance pour cinq micro-organismes. (1) *Mycoplasma gallisepticum* ; (2) *Salmonella oranienburg* ; (3) *Staphylococcus aureus* ; (4) *Halobacterium halobium* ; (5) *Xeromyces bisporus*.

D'après Baird-Parker A.C. *et al.* (1).

Figure 23 - Effet de l'abaissement de l' A_w sur la croissance des bactéries.
D'après Sainclivier M. (71)

Figure 24 - Réactions physiologiques de l'osmorégulation des bactéries.
D'après Gould (Sainclivier (71))

Figure 25 - Courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* C-243 en milieu de culture ajusté à diverse Aw avec des protéines hydrolysées.

D'après Troller J.A. *et al.* (Sainclivier (71))

Figure 26 – Effet de l'Aw sur le taux de croissance de *Salmonella oranienburg*.

D'après Christian J.H.B. (Sainclivier (71))

Figure 27 – Croissance de *St. Aureus 196 E* dans la bouillie de chair de crevette à différentes activités de l'eau.

D'après Troller J. A. (Sainclivier (71))

Figure 28 – Croissance de *St. Aureus C 243* dans de la bouillie de chair de crevettes à différentes activités de l'eau.

D'après Troller J. A. (Sainclivier (71))

b – Sur la croissance des champignons microscopiques

Levures et moisissures prolifèrent de préférence soit en milieu plus acide, soit dans un environnement plus sec ou plus concentré que les bactéries. Celles d'entre elles qui se multiplient aux valeurs d' A_w les plus basses sont appelées « levures osmophiles » et « moisissures xérophiles ». Ces groupes contiennent tous les champignons microscopiques capables de proliférer à des $A_w < 0.85$.

En ce qui concerne les levures osmophiles à mesure que l' A_w s'abaisse, la durée de la phase de latence augmente et le taux de croissance diminue (pente de la phase logarithmique la plus faible) (figure 29 et 30 page 51). De nombreuses levures prolifèrent à $0.85 < A_w < 0.95$ par exemple, en formant des films ou pellicules à la surface des liquides de marinage. Ce sont donc aussi des halophiles : dans des saumures de marinage de 4 à 20 % de sel, on a isolé des *Debaryomyces* :

- *Debaryomyces membranaefaciens* (et sa variété *hollandicus*) dans des saumures à 24 % de sel
- *Debaryomyces quilliermondii* (et sa variété *nova zeelandicus*) ($A_w = 0.85$)
- *Pichia membranaefaciens* et *Mycoderma decolorans* dans des saumures à 15 % de sel ($A_w = 0.91$)
- *Pichia ohmeri* et *Hansenula anomala* dans des saumures à des concentrations intermédiaires

Debaryomyces hansenii est commun dans les eaux océaniques, il peut survivre dans le sel des marais salants. Aucune levure ne semble pouvoir vivre en milieu saturé en sel à $A_w = 0.75$.

Les moisissures xérophiles sont les plus résistantes au séchage, elles survivent parfois à $A_w = 0.6$, bien que, le plus souvent 0.70 soit le minimum permettant leur croissance sur le poisson séché-salé pendant sa conservation :

<i>Aspergillus halophilus</i> à A_w 0.68	<i>Aspergillus candidus</i> à A_w 0.80
<i>Aspergillus restrictus</i> à A_w 0.70	<i>Aspergillus ochraceus</i> à A_w 0.80
<i>Wallemia sebi</i> à A_w 0.70	<i>Aspergillus flavus</i> à A_w 0.85
Groupe des <i>Aspergillus glaucus</i> à A_w 0.73	<i>Penicillium spp.</i> à A_w 0.8- 0.9

Sur le poisson salé-séché la moisissure la plus couramment rencontrée, formant des taches brun-grisâtres typiques, est le *Wallemia sebi* qui ne donne pas de mauvaises odeurs ni ne modifie la texture, de même que les taches brunes, noires ou fauves en surface du poisson salé-séché provenant des moisissures halotolérantes ou halophiles du type *Oospora* (ou *Geotrichum*). Les xérophiles sont généralement producteurs de mycotoxines notamment les *Aspergillus* et *Penicillium* mais on n'a que peu d'informations sur la manière dont la toxicogénèse est affectée par l'abaissement de l'activité de l'eau. De façon générale, la zone de toxicogénèse est plus étroite que la zone de croissance. Les A_w optimales sont sensiblement les mêmes (71).

Bien que les premières études suggèrent que certains champignons nécessitent la présence de sel, tout comme les bactéries halophiles, cela reste controversé. *Wallemia sebi*, considéré comme halophile par Frank et Hess (d'après Pitt (63)), pousse bien en milieu sucré (Vaisey d'après Pitt (63)). *Saccharomyces rouxii*, considéré comme un sucrophile obligatoire, croît bien en milieu hypersalé (63).

Toutefois, de nombreux travaux ont montrés qu'un organisme donné présente des réponses variables selon la nature du soluté utilisé et on peut établir que la nature du soluté joue un rôle important mais subordonné à celui de l'Aw sur la croissance des champignons.

Sont recensés dans le tableau VIII page 48 les principaux champignons xérophiles connus.

Il apparaît que seulement onze genres de champignons sont présents : ce sont tous des ascomycètes ou des formes asexuées d'ascomycètes. En 1971, Ainsworth (d'après Pitt (63)) a estimé à environ 5000 le nombre de genres de champignons parmi lesquels 3500 sont des ascomycètes ou des formes asexuées d'ascomycètes. La capacité de croître à des valeurs d'Aw inférieures à 0.85 est réservée à de rares champignons très spécialisés (63).

Tableau VIII – Les champignons xérophiles connus et leurs Aw minimales (63)

Champignons	Aw minimum	Température (°C)
<i>Aspergillus candidus</i>	0.75	25
<i>A. conicus</i>	0.70	22
<i>A. flavus</i>	0.78	33
<i>A. fumigatus</i>	0.82	40
<i>A. niger</i>	0.77	40
<i>A. ochraceus</i>	0.77	35
<i>A. restrictus</i>	0.75	25
<i>A. sydowii</i>	0.78	25
<i>A. tamaraii</i>	0.78	25
<i>A. terreus</i>	0.78	33
<i>A. versicolor</i>	0.78	37
<i>A. wentii</i>	0.84	25
<i>Chrysosporium fastidium</i>	0.69	25
<i>C. xerophilum</i>	0.71	25
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.83	25
<i>Emericella nidulans</i>	0.78	25
<i>Eremascus albus</i>	0.70	37
<i>E. fertilis</i>	0.77	25
<i>Eurotium amstelodami</i>	0.70	25
<i>E. carnoyi</i>	0.74	25
<i>E. chevalieri</i>	0.71	25
<i>E. echinulatum</i>	0.62	33
<i>E. herbariorum</i>	0.74	25
<i>E. repens</i>	0.71	25
<i>E. rubrum</i>	0.70	21
<i>Monascus bisporus</i>	0.61	25
<i>Paecilomyces variotii</i>	0.84	25
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.81	25
<i>P. chrysogenum</i>	0.79	23
<i>P. citrinum</i>	0.80	25
<i>P. cyclopium</i>	0.81	25
<i>P. expansum</i>	0.83	25
<i>P. fellutanum</i>	0.80	23
<i>P. frequentans</i>	0.81	25
<i>P. islandicum</i>	0.83	23
<i>P. martensii</i>	0.79	31
<i>P. palitans</i>	0.83	23
<i>P. patulum</i>	0.81	23
<i>P. puberulum</i>	0.81	23
<i>P. spinulosum</i>	0.80	23
<i>P. viridicatum</i>	0.81	22
<i>Saccharomyces bailii</i>	0.80	23
<i>S. rouxii</i>	0.62	25
<i>Wallemia sebi</i>	0.75	30

Les espèces *Aspergillus* et *Penicillium* sont les moins xérophiles et peuvent croître à des valeurs d'Aw légèrement inférieures à l'unité. A l'autre bout de l'échelle, les plus xérophiles, *Monascus bisporus*, *Saccharomyces rouxii* et *Eurotium echinulatum* peuvent croître aux environs de Aw = 0.6. Selon Falk et al. (d'après Pitt (63)), l'ADN se déstructure pour des Aw d'environ 0.55.

En incluant les *Eurotium* et les *Emericella* presque la moitié des espèces listées dans le tableau VIII appartiennent au genre *Aspergillus*. Ce dernier a non seulement développé sa capacité de croître à de faibles valeurs d'Aw mais s'est aussi diversifié en de nombreuses espèces, occupant une vaste gamme de niches écologiques à basse Aw. Ainsworth (d'après Pitt (63)) considère qu'il y aurait à peu près 50 espèces d'*Aspergillus* pour la plupart xérophiles (63).

c – Sur la sporulation et la germination des spores

Généralement l'Aw minimum provoquant la sporulation bactérienne est inférieure à celle permettant la croissance végétative (ex. *Bacillus cereus* 0.95 *Clostridium perfringens* 0.97 ou en dessous, au lieu de 0.995). En fait, on n'a que peu de travaux sur la sporulation, en dehors de ceux sur *Clostridium botulinum* qui montrent que le type E paraît beaucoup plus sensible aux conditions limites d'humidité que les types A et B. Par contre quelques informations sur la germination des spores des *Bacillus* et *Clostridium* en fonction de l'Aw nous indiquent qu'elles commencent à germer à des valeurs d'Aw sensiblement inférieures à celles qui permettraient la croissance en phase végétative. Par exemple *Clostridium perfringens* = 0.94 – *Clostridium botulinum* A, B, E = 0.93 en présence de NaCl mais le sel freine la croissance en dessous de Aw = 0.96 pour les types A et B, 0.97 pour E, ce qui signifierait que le sel affecte la séquence de croissance entre la germination et les phases consécutives. Une concentration en NaCl deux fois plus élevée que celle suffisant à empêcher la croissance végétative, inhibe la germination des spores de *Bacillus*. La sporulation des moisissures en fonction de l'Aw n'a pas été étudiée (71).

d – Sur la production de métabolites et notamment de toxines.

L'influence de l'Aw sur la biosynthèse de nombreux métabolites chimiques élaborés par les micro-organismes n'a été que peu étudié en ce qui concerne les aliments en général. L'activité de l'eau peut stimuler les Dnases, tributyrinases, trioléinases, catalases, coagulases et phosphatases acides. Par contre les protéases (acides et alcalines) sont plus actives à une Aw un peu plus faible, vers 0.94, et à l'exception de l'activité des protéases, celles des autres enzymes est généralement en relation avec l'importance de la croissance.

En raison de leur signification sanitaire, c'est surtout la production de toxines qui a retenu l'attention des chercheurs. En ce qui concerne les bactéries sporulées du genre *Clostridium*, il semble que la synthèse des neurotoxines soit en relation directe avec la sporulation, mais la formation de toxines serait inhibée par des teneurs de 1.5 à 2 % de NaCl alors qu'il en faut 4.5 à 5.5 % pour inhiber la croissance ; la neurotoxine apparaît donc dès les valeurs de Aw = 0.94 mais il y a de grandes variations selon les types de *Clostridium*. Il en est de même pour la production d'entérotoxines par *Staphylococcus aureus* (il existe de grandes variations selon les types d'entérotoxines produites). L'entérotoxine B paraît quelque peu sensible au moindre abaissement de l'Aw (figure 30 page 51), on observe une diminution importante de production à $0.97 < Aw < 0.99$ alors que pour l'entérotoxine A, le déclin de production se situe à $0.93 < Aw < 0.95$ en anaérobiose et à $0.87 < Aw < 0.89$ en aérobie. Le déclin de production de toxine ne serait pas dû dans ce cas à une quantité inférieure de cellules mais, plus probablement, à une influence directe de l'humidité du biosystème sur l'activité toxigène ; ceci expliquerait par exemple que l'on puisse trouver sur des poissons partiellement déshydratés beaucoup de Staphylocoques et peu ou pas de toxines. Mais, si l'un des autres facteurs d'influence tels que la température ou le pH se trouvent au-dessus ou en dessous de l'optimum, croissance du staphylocoque et production de toxines vont de paire, elles diminuent toutes les deux. Des essais sur chair de crevettes ont confirmé, non seulement l'effet inhibiteur de l'abaissement de l'Aw sur la

synthèse de l'entérotoxine B, mais aussi probablement un transfert restreint d'entérotoxines au travers des membranes cellulaires bactériennes.

Quelques moisissures peuvent produire des mycotoxines. Par exemple *Aspergillus ochraceus*, dont la croissance peut commencer à $A_w = 0.76$ sécrète de l'acide pénicillique et de l'ochratoxine à des A_w de, respectivement, 0.81 et 0.85.

Tableau IX - Effets de A_w sur la croissance et la formation de mycotoxines par quelques moisissures.

Moisissure	Toxines	Aw minimum pour	
		La croissance	La toxinogénèse
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxine	0.78 – 0.80	0.83
<i>Penicillium patulum</i>	Patuline	0.81	0.85
<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxine	0.77	0.85
<i>A. ochraceus</i>	Acide pénicillique	0.76	0.81
<i>Stachybotrys</i>	Stachybotryne	0.94	0.94

Les plus dangereuses, au plan sanitaire, sont les aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* et, très voisin, *Aspergillus parasiticus*. Des taux de 600 à 700 ppm ont été observés sur du poisson séché mais, si on a bien isolé *A. flavus* de poisson salé-séché au Viêt-nam, on n'a pas signalé de cas d'intoxication. De même les aflatoxines B1 et G1 de trois souches différentes d'*A. flavus* ont été isolées de crevettes séchées. En fait si le problème aflatoxine peut exister, l'intoxication n'est pas évidente.

Le tableau X page 52 recense les différents champignons xérophiles producteurs de toxines.

Figure 29 – Courbes de croissance de *Geotrichoïdes sp.* à diverses Aw sur tranches de muscles
D'après Scott W.J. (Sainclivier (71))

Figure 30 – Relations entre taux de croissance et Aw de quatre moisissures :
Aspergillus niger à 20 °C
Aspergillus glaucus à 20 °C
Aspergillus amstelodami à 25 °C
Xeromyces bisporus à 25 °C
D'après Scott W.J. (Sainclivier (71))

Figure 31 – Effet de l'Aw sur la synthèse de l'entérotoxine B de *St. Aureus*
D'après Troller J.A. (Sainclivier (71))

Tableau X - Mycotoxines isolées de champignons xérophiles (63)

<i>Champignons</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxine Acide aspergillique Aspertoxine
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocystine
<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxine Acide pénicillique
<i>A. fumigatus</i>	Fumagilline Gliotoxine Acide helvolique
<i>Eurotium amstelodami</i>	Pas de dénomination
<i>E. chevalieri</i>	Xanthocilline X
<i>Emericella nidulans</i>	Sterigmatocystine
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinine
<i>P. cyclopium</i>	Tremortine A et B Acide pénicillique Acide cyclopiazonique
<i>P. expansum</i>	Citrinine Patuline
<i>P. islandicum</i>	Islanditoxine Cyclochlorotine Lutéoskyrine
<i>P. martensii</i>	Acide pénicillique
<i>P. palitans</i>	Citrinine Acide pénicillique
<i>P. patulum</i>	Patuline
<i>P. viridicatum</i>	Citrinine Ochratoxine A
<i>P. puberulum</i>	Acide pénicillique

Pour certains, la production de toxine a été mise en évidence dans les conditions naturelles, pour les autres seulement en laboratoire. Il apparaît que toutes les espèces xérophiles présentes appartiennent aux *Aspergillus* (incluant les *Eurotium* et les *Emericella*) et aux *Penicillium*.

Ainsi, un grand nombre de champignons xérophiles ubiquistes sont capables de mycotoxicogénèse. Cependant, les conditions nécessaires à cette toxicogénèse restent largement obscures.

e – Intervention conjuguée d'autres facteurs avec l'Aw sur la croissance

La plupart des observations publiées sur les relations Aw – croissance microbienne sont établies alors que tous les autres facteurs sont à leur optimum pour l'organisme concerné et qu'il n'y a pas d'inhibiteurs présents. Si l'un de ces facteurs est en dessous de son optimum, l'effet de l'abaissement de l'Aw est augmenté. Le tableau XI montre le comportement de quelques groupes en fonction du milieu (34).

Tableau XI – Comportement de quelques groupes microbiens en fonction du milieu (34).

	pH			Temp. (°C)			Aw
	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.	Maw
Levures	1,5/3,5	4,0/7,0	8,0/9,0	1°/20°	10°/30°	25°/60°	0,92/0,65
Moisissures	1,2/3,0	4,0/7,0	8,0/11	-5°/15°	10°/35°	35°/60°	0,93/0,62
Bactéries lactiques	3,5/5,0	5,5/6,0	6,5/9,0	5°/10°	25°/35°	35°/60°	0,94/0,92
Entérobactéries	3,5/4,5	6,0/8,0	7,5/9,0	5°/10°	25°/37°	30°/50°	0,97/0,96
Microcoques	4,0/4,5	6,5/7,5	8,5/9,3	5°/10°	25°/40°	40°/50°	0,91/0,86

La température agit comme l'Aw : généralement les micro-organismes offrent une plus grande tolérance vis à vis des Aw peu élevées aux températures voisines de leur optimum de croissance, par exemple avec *Aspergillus ruber* la croissance apparaît à : Aw 0.85 à 5°C – 0.80 à 10°C – 0.725 à 20°C et 30°C – 0.75 à 35°C – 0.80 à 37°C.

Les limites de pH à l'intérieur desquelles on observe une croissance sont rapprochées lorsque l'Aw s'abaisse (figure 32 page 54). Cela a été observé pour *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Sacharomyces cerevisiae* et avec des moisissures.

L'oxygène agit naturellement différemment selon le type de micro-organisme. Avec des bactéries aéro-anaérobie facultatives, l'Aw minimum permettant la croissance est moins élevée en aérobiose qu'en anaérobiose (*Staphylococcus aureus* Aw = 0.86 en aérobiose ; 0.92 en anaérobiose ; on a observé à peu près les mêmes valeurs avec des Salmonelles).

Le gaz carbonique (CO₂), dans un biosystème à basse Aw, augmenterait significativement le temps de génération lorsqu'il est présent de 5 à 10 % dans l'air environnant mais le diminuerait aux valeurs élevées d'Aw. Cet effet inhibiteur est surtout marqué aux basses températures (- 1°C) et a été observé avec les micro-organismes suivants : *Geotrichoïdes*, *Candida*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* (figure 33 page 54)

Figure 32 – Effet de l'Aw et du pH conjugués sur la croissance des micro-organismes.
D'après Mossel (Sainclivier (71))

Figure 33 – Relation entre tolérance au CO₂ et Aw à – 1 °C pour

1 – *Geotrichoïdes Y 9*
2 – *Candida Y 1*
3 – *Achromobacter n° 5*

4 – *Achromobacter n° 483*
5 – *Achromobacter n° 7*
6 – *Pseudomonas*

D'après Scott W.J. (Sainclivier (71))

3 – Rôles spécifiques du sel

a – Rôle du NaCl

Comment la chlorure de sodium agit-il sur les micro-organismes ? Plusieurs types d'action ont été proposés :

- l'action inhibitrice serait due à la diminution de l'activité de l'eau dans la chair (voir infra.) mais aussi au fait que le sel déshydrate aussi les bactéries. (Plasmolyse ?)
- l'effet toxique de l'ion Cl^- (bien qu'il soit fortement lié à l'ion Na^+ et que le Cl^- naissant ne soit qu'en faible quantité) ; Il formerait un complexe létal avec les protéines cellulaires.
- Le sel réduirait la solubilité des gaz (donc de l'oxygène)
- Le sodium lui-même aurait un effet toxique sur les micro-organismes en se combinant avec les anions protoplasmiques des cellules.
- Le sel interférerait avec certains systèmes enzymatiques protéolytiques (71).

b – Rôle des impuretés du sel

Le sel naturel n'est pas absolument pur. Le plus souvent il contient des impuretés, essentiellement des sulfates et chlorures de calcium et de magnésium. Seul le sulfate de calcium, pratiquement insoluble, n'a que peu d'action. Les autres jouent un rôle important sur l'efficacité et la qualité du salage. Plus le sel contient d'impuretés plus il est hygroscopique.

De plus, les ions Ca^{++} et Mg^{++} se fixent sur les protéines à la place du Na^+ et entravent son action bactériostatique. Le chlorure de calcium « neutraliserait » ainsi l'effet toxique du chlorure de sodium sur les bactéries contaminantes. Par contre les impuretés calciques et magnésiennes favoriseraient, sous certaines conditions, le développement de certaines bactéries halophiles, par exemple pour le poisson celles donnant lieu assez rapidement au « rouge » de la morue : lorsqu'une même proportion de magnésium se trouve à côté du calcium, le développement du rouge est intense.

D'autre part les ions Ca^{++} et Mg^{++} réagissent avec les radicaux phosphoriques des nucléotides et se déposent immédiatement sous la surface au contact avec le sel en formant des microcristaux de phosphate de calcium et ammoniaco-magnésiens qui colmatent facilement, entravant ainsi la pénétration du sel (71).

4 -Déterminisme de la résistance au sel

Nous avons vu précédemment qu'en raison de leur comportement en présence de sel, les micro-organismes peuvent être classés en deux groupes bien distincts l'un de l'autre auxquels s'adjoint un troisième ayant des caractéristiques intermédiaires :

Les halophobes (ou halosensibles) ne supportent pas le sel, ils sont inhibés par des concentrations relativement faibles.

Les halophiles ne se développant pas en l'absence de sel. La concentration en sel optimum pour leur croissance se situe toujours au delà de 2 %.

Les halotolérants représentent ce groupe intermédiaire cité ci-dessus qui supporte des teneurs très variables de sel. Ce sont pour la plupart des microcoques, des bactéries sporulées, quelques anaérobies tels que *Clostridium botulinum*. Ils se développent bien à des teneurs supérieures à 6 % de sel et même parfois jusqu'à saturation mais alors beaucoup plus lentement. Il ne faudrait pas oublier *Listeria monocytogenes* à l'origine de la listériose dont la fréquence augmente chez l'homme sans doute en raison d'une surveillance épidémiologique plus organisée mais aussi en raison de l'allongement des chaînes alimentaires et du développement de la restauration collective.

a - Pour les bactéries

Le problème qui se pose aux bactéries banales non halophiles est de lutter contre le stress osmotique éventuel. Cela exige presque invariablement que la cellule accumule en son sein un composé physiologiquement bénin et « osmotiquement actif » pour contrebalancer la pression osmotique à travers la paroi cellulaire aux faibles A_w . On appelle ces composés des « solutés compatibles ». Les cellules les moins osmotolérantes, les moins équipées pour croître aux faibles A_w accumulent l'acide glutamique, les bactéries modérément tolérantes l'acide γ -amino-butyrique, les bactéries osmotolérantes (*Staphylococcus aureus*) la proline, et enfin les bactéries halophiles semblent avoir la possibilité d'accumuler des ions K^+ et de les tolérer à un niveau assez élevé dans leur environnement interne. Ces réactions physiologiques sont sommairement résumées figure 24 page 44.

b - Pour les levures et les moisissures

La production et l'accumulation de polyols par les moisissures est connue depuis un certain temps. Nickerson et Carroll (d'après Pitt (63)) ont mis en évidence la production de glycérol par *Saccharomyces bailii* ; Spencer et Sallans (d'après Pitt (63)) ont montré que plus de 79 souches de moisissures xérophiles produisaient du glycérol alors que d'autres produisaient de l'arabitol ou de l'érythrol.

On a notamment suggéré que les polyols servaient de source d'hydrate de carbone (Lee -d'après Pitt (63)-) ou d'accepteur d'hydrogène (Corina et Munday – d'après Pitt (63)-). Brown et Simpson (d'après Pitt (63)) ont suggéré que les polyols agissaient en temps que « soluté compatible » qui à forte concentration permettait aux systèmes enzymatiques de continuer à fonctionner.

Par ailleurs, Onishi (d'après Pitt (63)) a constaté l'absence d'enzymes halotolérantes chez les moisissures halotolérantes. Il en conclut à un mécanisme autorisant la vie des moisissures en milieu hypersalé différent de celui des bactéries. Brown et Simpson (d'après Pitt (63)) ont montrés une efficacité cinq fois plus importante de la NADP isocitrate déshydrogénase extraite de *Saccharomyces rouxii* en présence de glycérol qu'en présence de saccharose. Ces deux derniers résultats ont confortés l'hypothèse de Brown et Simpson (d'après Pitt (63)) : le soluté compatible pour *Saccharomyces rouxii* est le glycérol et non le saccharose, le potassium ou encore le sodium.

5 – Les micro-organismes des denrées alimentaires animales et leur Aw optimales

a - Les bactéries

Tableau XII – Principales bactéries rencontrées dans les denrées alimentaires d'origine animale (9).

GRAM +

COCCI

Catalase +

- aérobie : *Micrococcus*
- aéro-anaérobie : *Staphylococcus*

Catalase –

- aéro-anaérobie : *Streptococcus* (*Leuconostoc*, *Pediococcus*,
Aerococcus)

BATONNETS

Non sporulants

- Lactobacillus*
- Propionibacterium*
- Corynebacterium*

Sporulant

- aéro-anaérobie – *Bacillus*
- anaérobie – *Clostridium*

GRAM –

BATONNETS

Germes aéro-anaérobies

Entérobactéries

- lactose + - coliformes – *E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*,
Enterobacter
- lactose - - *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia*
- *Serratia – Proteus*

Autres

- Vibrio*
- Campylobacter*
- Aeromonas*
- Chromobacterium – Flavobacterium*

Germes aérobies stricts

- Pseudomonas*
- Acinetobacter*
- Psychrobacter*
- Alcaligenes*
- Autres germes : Halobacterium et Halococcus*

Germes anaérobies

- Bacteroides*

b – Les levures et les moisissures

On dénombre une quarantaine de genres et environ 350 espèces. Les colonies mates sont plus ou moins pigmentées : crèmes, grises, quelquefois jaunes, roses, rouges ou vertes.

Les bactéries les empêchent le plus souvent de se développer. Elles sont rencontrées dans les produits salés (jambons) ou sucrés. Elles sont anaérobies facultatives. On peut citer par exemple :

- *Saccharomyces*,
- *Candida*,
- *Rhodotorula*,
- *Torulopsis*,
- *Trichosporon*,
- *Debaryomyces*.

Ces levures peuvent être à l'origine d'altérations des salaisons de viandes, des produits laitiers, des produits de la mer.

Leur autolysat permet d'obtenir des produits d'aromatisation à la place d'extraits de viande.

Les moisissures comprennent de nombreux genres et espèces. Elles sont obtenues sur milieu à pH acide, sont aérobies strictes. Elles sont à l'origine d'altérations superficielles ; certaines souches produisent des toxines. Beaucoup sont utilisées dans la fabrication de fromages, saucisson sec, enzymes, antibiotiques.

Les principaux genres rencontrés sont :

- *Alternaria* est à l'origine de la rancidité et de la mauvaise odeur des produits laitiers.
- *Aspergillus* : On dénombre plus de 100 espèces parmi lesquelles *A. flavus* et *A. parasiticus* produisent des aflatoxines.
- *Cladosporium* provoque taches noires sur le tissu conjonctif et les graisses des carcasses réfrigérées.
- *Geotrichum-Sporotrichum* provoque des points blancs sur la viande.
- *Penicillium* donne des taches blanches puis vertes sur les tissus conjonctifs et les graisses des carcasses réfrigérées. *P. camemberti* est à l'origine de la « fleur » du camembert, *P. roqueforti* intervient dans la fabrication des bleus et du roquefort.
- *Scopulariopsis*. Responsable de la mauvaise odeur de certains fromages et de la formation de colonies cotonneuses crèmes à chocolat sur les viandes et les jambons.
- *Thamnidium (T. elegans)* provoque l'apparition de poils de chat sur les viandes fraîches (9).

Tableau XIII - Aw minimales pour la croissance des micro-organismes de la viande et des produits carnés (48)

Aw	Bactéries	Levures	Moisissures
0.98	<i>Pseudomonas</i>	-	-
0.97	<i>Clostridium</i>	-	-
0.96	<i>Flavobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Proteus, Pseudomonas, Shigella</i>	-	-
0.95	<i>Alcaligenes, Bacillus, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Vibrio</i>	-	-
0.94	<i>Lactobacillus, Microbacterium, Pediococcus, Streptococcus</i>	-	-
0.93	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Vibrio</i>	-	<i>Rhizopus, Mucor</i>
0.92	-	-	-
0.91	<i>Corynebacterium, Staphylococcus (en anaérobiose), Streptococcus</i>	-	-
0.90	<i>Micrococcus, Pediococcus</i>	<i>Saccharomyces, Hansenula</i>	-
0.88	-	<i>Candida, Torulopsis</i>	<i>Cladosporium</i>
0.87	-	<i>Debaryomyces</i>	-
0.86	<i>Staphylococcus (en aérobiose)</i>	-	-
0.85	-	-	<i>Penicillium</i>
0.75	<i>Bactéries halophiles</i>	-	-
0.65	-	-	<i>Aspergillus</i>

Lorsque l'Aw s'abaisse en dessous de 0.95, la multiplication de la plupart des bactéries Gram négatif et des bactéries sporulantes des genres *Bacillus* et *Clostridium* est inhibée. Certaines bactéries Gram positif, dont celles utilisées pour certaines fermentations (*Lactobacillus*, *Pediococcus* ou *Micrococcus*) tolèrent des Aw plus basses. Au sein d'un même genre, il y aurait des souches qui seraient mieux adaptées à proliférer à de basses valeurs de l'Aw. Les moisissures et champignons des genres *Debaryomyces* et *Penicillium*, employés dans la fermentation de certaines saucisses, sont également remarquablement actifs aux faibles valeurs d'Aw.

En ce qui concerne les bactéries pathogènes, les Shigelles sont inhibées à des Aw < 0.96 et les Salmonelles, *Escherichia* ainsi que les Vibrios à des Aw < 0.95. La croissance et la production de toxines par *Clostridium botulinum* type C seraient entravées à partir de Aw = 0.98, à partir de 0.97 pour le type E et en dessous de 0.95

pour les *Clostridium* A et B et pour *Cl. perfringens*. Indubitablement, *Staphylococcus aureus* serait le pathogène tolérant les plus basses Aw : en anaérobiose, sa croissance serait inhibée à Aw = 0.91 et en aérobie à Aw < 0.86. La production d'entérotoxine, par contre, cesserait à Aw = 0.94. Notons que *Listeria monocytogenes* peut survivre 10 jours à 22 °C dans des saumures contenant 20 à 30 % de sel et 100 jours à 4 °C dans des saumures contenant entre 10.5 et 30 % de sel.

III - INTERETS ET LIMITES DU SEL EN AGRO-ALIMENTAIRE

Le sel destiné à la consommation humaine a un double rôle de nutrition et de conservation des aliments.

La teneur en sel des aliments est très variable, de plus de 40 % dans le cas de préparations très concentrées comme les bouillons en sachets, à seulement quelques pour-cent pour les plats préparés, le pain, les fromages, etc.

Suivant son degré de concentration en sel, l'eau salée n'autorise le développement que de certains micro-organismes au détriment d'autres qui sont soit détruits, soit inactivés. On dit que le sel est un antimicrobien sélectif ou un agent bactériostatique. Ce rôle, à la fois d'inhibiteur-retardateur et de régulateur-orientateur sur le développement et la prolifération des micro-organismes, est mis à profit en conserverie notamment des viandes et du poisson (salaison) ainsi que dans les processus de fabrication, puis d'affinage des fromages.

Il arrive parfois que des micro-organismes indésirables et/ou leurs produits contaminent les aliments à l'origine d'altérations ou pire de maladies.

A – FACTEURS DE DEVELOPPEMENT DES MICRO-ORGANISMES DANS LES ALIMENTS SALES

1 – Importance de la contamination initiale

a – Sur le plan quantitatif

Classiquement, on affirme que la phase de latence est d'autant plus courte que le nombre initial de germes est élevé (figure 34 page 63). Les altérations apparaîtraient donc dans un délai qui dépendrait en grande partie du soin apporté pour minimiser les contaminations (figure 35 page 63).

Il n'en demeure pas moins que l'importance du caractère paucimicrobien sur les qualités finales d'un produit se retrouvera pour tous les procédés de conservation ou de transformation.

b – Sur le plan qualitatif

Dans une population mixte, l'espèce quantitativement dominante dès le départ risque de l'emporter par la suite. La loi du plus grand nombre détermine soit la fermentation recherchée soit l'altération à éviter. Ainsi l'emploi de ferments bactériens suppose :

- qu'ils soient apportés en nombre suffisant ;
- que la flore du produitensemencé soit faible (9) ;

Figure 34 - Courbes de croissance des bactéries en fonction de la contamination initiale
D'après Carlier V., Bolnot F., Rozier J. (9)

Figure 35 - Durée d'apparition des altérations d'odeur d'une carcasse de mouton en fonction de la contamination initiale et de la température de conservation.

D'après Carlier V., Bolnot F., Rozier J. (9)

2 – L'Aw et les autres paramètres physico-chimiques

Les micro-organismes sont sensibles aux variations de l'Aw mais également à d'autres facteurs comme notamment la température, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, les radiations et autres facteurs chimiques (acides organiques, agents chélateurs (EDTA, polyphosphates, acides ascorbique et isoascorbique), agents oxydants (H₂O₂, nitrites), fumée, antibiotiques, gaz...

B – LES ALTERATIONS DES PRODUITS SALES

La plupart des aliments d'origine animale sont périssables. Plusieurs agents peuvent intervenir : physiques (déshydratation superficielle ou profonde), chimiques (oxydation des pigments et des graisses et réaction des composants entre eux), biochimiques (intervention des enzymes tissulaires) et microbiologiques. Nous nous limiterons à ce dernier point.

1 – Dégradations

Les altérations microbiologiques peut se définir comme le stade atteint lorsque les caractéristiques de l'aliment sont si modifiées par la croissance et l'activité des micro-organismes qu'elle le rende impropre à la consommation.

a – caractères

a – 1 étude générale

- développement en surface

Le développement de la flore superficielle se traduit dans un premier temps par des anomalies d'odeur, puis dans un deuxième temps par des anomalies d'aspect. Cela commence par l'apparition de colonies de micro-organismes comparables à de petites gouttelettes translucides ou opaques, blanches ou colorées en jaune, rouge, violet, mates ou brillantes. Les taches s'élargissent, s'épaississent et peuvent, par coalescence, former un revêtement plus ou moins continu, lisse ou finement granuleux, teinté ou non. Il s'agit du «limon» constitué de bactéries, parfois de levures et de leur production de mucopolysaccharides. Dès le début du phénomène la surface de l'aliment est devenue poisseuse, gluante, collante, visqueuse, voire muqueuse. C'est le «poissage».

Le développement des moisissures se traduit, quand à lui, par de petites taches blanches qui s'agrandissent puis produisent soit des « poils de chat » (*Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*), soit un fin feutrage, soit des taches rugueuses colorées de façon diverse : blanches (*Sporotrichum*), noires, vertes (*Cladosporium*) ou brunes (*Penicillium*).

- développement en profondeur

Le développement en profondeur des micro-organismes s'accompagne d'odeurs anormales diverses, de plus en plus fortes, puis de modifications de la couleur, de la consistance, et éventuellement de la texture. Les tissus ont tendance à se ramollir. Le lait à l'inverse coagule ou peut devenir filant, visqueux (*Streptococcus salivarius*, *Str. Bovis*, *Alcaligenes viscolactis*). La production de gaz plus ou moins odorants peut provoquer la formation de logettes, de fissures, de bulles, de mousses qui, si elles sont retenues dans l'aliment, provoquent son gonflement.

Qu'il soit superficiel ou profond, et comme il a été signalé, le développement des germes s'accompagne précocement d'odeurs variées : d'abord fades, parfois fruitées, maltées ou autres, puis fortes, butyriques, ammoniacales, sulfureuses, sulfhydroammoniacales, alliacées, de moisi, de mofette, etc.

Les aspects décrits ne sont que les premières étapes d'un processus de minéralisation. En effet, si l'altération d'un aliment, d'un morceau de viande par exemple, se poursuivait pendant plusieurs mois, le ramollissement s'accentuerait, une consistance mastic serait obtenue. L'odeur s'atténuerait, elle deviendrait comparable à celle de l'humus. Puis, peu à peu, le volume diminuant et l'odeur disparaissant, il ne resterait plus qu'un tas de cendres !... La minéralisation serait achevée.

Les premières étapes de cette minéralisation, stade des cycles de l'azote, du carbone, de l'oxygène et de l'hydrogène, constituent la putréfaction. Ce début de décomposition de la matière organique porte aussi le nom pourriture, fermentation, corruption.

Les aspects varient quelque peu avec les différents types d'aliments si bien que nous étudierons les altérations des différents aliments dans lesquels le sel est incorporé en tant qu'agent conservateur (9).

a – 2 Etude particulière

a – 2 - 1 Exemple typique du poisson salé

Un produit convenablement préparé présente une teneur en bases azotées volatiles à peine plus élevée que celle du poisson frais et demeure ainsi pendant la conservation. A titre indicatif les valeurs suivantes sont observées : N volatil total % N total = environ 2 % ; N de l' NH_3 % N total = 1.3 à 1.7 % ; N de TMA = environ 0.3. L'augmentation de ces taux dénote une altération en cours. C'est surtout la formation d' NH_3 qui marque l'altération

Les altérations les plus fréquentes du poisson salé sont d'ordre bactériologique : les bactéries contaminantes sont en effet activées en milieu contenant 1 % de sel, elles restent actives jusqu'à 6 à 8 % de sel et au-delà elles sont inactivées ou détruites sauf certaines bactéries halophiles qui se développent au-delà de 12 à 13 % de sel ; parmi celles-ci on retrouvera aussi des agents d'altération du poisson salé. Le tableau XIV page 69 montre le barème de cotation du poisson en fonction des altérations rencontrées.

– La graisse

La «graisse» est une altération du poisson salé dont la texture devient pâteuse comme du mastic ; elle est observée sur la morue légèrement salée (de Gaspé). Les bactéries responsables sont approximativement : 80 % bâtonnets Gram -, 11 % *Cocci* Gram -, 5.5 % *Cocci* Gram + et 2.7 % de bâtonnets Gram +. L'apparence est semi-graisseuse, gluante, jaune-gris ou beige, l'odeur piquante ; elle apparaît, notamment lors de séjours trop longs, en pile, dans les parties épaisses du poisson où le taux de salage est le plus faible (pénétration plus lente), si la température est trop élevée et l'humidité relative exagérée.

– Les altérations de la couleur des chairs

Le rouge de la morue salée est bien connu des sauteurs : des tâches roses ou rouges apparaissent sur les bords des piles de poissons en cours de salage. Les tâches ont tendance à s'étendre le long de l'arrête médiane notamment si la température est douce (15-20 °C sur la morue verte) et l'atmosphère humide. Si l'on ne traite pas (brossage, lavage, séchage) les taches s'étendent (la chair se ramollit), pénètrent dans la pile entière, le poisson s'affadit et devient nauséabond.

Le rouge a été signalé et attribué aux bactéries il y a un siècle. Ce qui est remarquable dans la flore subsistant dans la morue salée est la prédominance d'organismes à pigmentation variant du jaune-orangé aux rose pâle et rouge carmin. La croissance optimum pour la croissance de ces germes est de l'ordre de 35 °C mais ils prolifèrent encore à 15 °C. La plupart des souches sont aérobies, soit protéolytiques par elles-mêmes, soit vivant associées à des protéolytiques d'où l'odeur caractéristique.

Boury (d'après Sainclivier (71)), en 1934, avait résumé les très nombreux travaux tentant depuis 1880 d'identifier les responsables du rouge ; les plus fréquemment cités étaient : *Sarcina morhua* (1878), *Sarcina littoralis* (1880), tous deux probablement identiques et que Van Klaveren (d'après Sainclivier (71)) retiendra, plus tard, aussi avec *Pseudomonas salinaria* (1922), *Penicillium roseum* (1886), *Bacillus rubescens* (1887), *Micrococcus rubroviscus* (1921). D'autres chercheurs isolent dans les années 30 certains des germes cités ci-dessus ainsi que *Bacillus halobius ruber* (1931) asporogène et une torula : *Torula wehmeri*. Des efforts de systématique seraient à tenter sur ce sujet : en fait, il est difficile d'identifier toute cette flore hautement polymorphe, la même souche variant de la forme levure à celles de *Cocci*, bâtonnets, *Vibrio*, spirochètes ou filamenteux...il n'est donc pas surprenant que la taxonomie de ces micro-organismes soit très imprécise. Nous ne retiendrons, avec Kushner D.J. (d'après Sainclivier (71)) que deux groupes exigeant la proportion de 10 à 15 % de sel :

- Halobacterium* Gram négatif, flagelles polaires, bâtonnets non sporulés, polymorphe
- Halococcus* Gram négatif ou *Cocci* Gram±, croît mieux avec 20 à 30 % de sel (min. 10%).

En raison de leur polymorphisme les auteurs les ont classés différemment comme étant des : *Bacillus*, *Spirochètes*, *Pseudomonas*, *Serratia* et même levures.

Les bactéries pigmentées se multiplient rapidement, en présence de teneurs en sel de 10 à 15 %, elles se développent même sur des cristaux de sel humides. Après stockage au sec pendant deux mois, 99 % d'entre-elles disparaissent du sel, ce qui explique l'usage préférentiel du vieux sel par les saleurs. Précisons que la survivance de bactéries dans le sel sec est controversée, elle ne s'observerait que sur les sels impurs des marais salant. Or à la fin du XIX siècle par exemple, le sel de marais salant contenait un fort pourcentage d'impuretés salines et, à cette même époque, on pêchait beaucoup le hareng en mer du Nord pendant la belle saison, c'est à dire quand il est gras. On sait que pour saler le hareng gras le sel pur vaut mieux, ce qui explique la préférence du vieux sel plus pur.

Puisque l'origine du rouge peut être le sel lui-même, il convient soit de traiter le sel contaminer par la chaleur soit, puisque la contamination tend à décroître avec le temps, de ne réutiliser que du sel stocké depuis longtemps. De toute manière cela n'écarte pas totalement le risque puisque la contamination peut être d'autre origine que le sel. On peut remédier au défaut en abaissant la température des locaux (+5 à 7 °C), où sont les piles atteintes. Les locaux et l'équipement peuvent héberger les germes halophiles et, si une manifestation intempestive de « rose » apparaît, un programme minutieux de désinfection s'impose avec d'abondantes quantités d'eau additionnées de désinfectants convenables : savons, cristaux de sodes, lessives alcalines à 1 ou 2 M, acide sulfureux à 2%, chlorure de chaux, lait de chaux pour le badigeonnage des murs.

Précisons enfin que le rouge n'est pas nocif, mais il favorise d'autres altérations

- Les taches jaunes

Les consommateurs de morue salée préfèrent le plus souvent une chair blanche. Or il arrive que la chair soit colorée superficiellement en jaune sous l'influence d'une contamination par staphylocoques (*Staphylococcus aureus*). Ceux-ci peuvent en effet se développer en milieu hypersalé, mais si la teneur en eau est réduite à 50 %, il y a peu de risque à voir cet accident se produire. De toute façon la coloration jaune d'origine bactérienne est facilement reconnaissable à l'odeur désagréable dégagée. Parmi les taches jaunes, il faut aussi signaler celles dues au sang lors de meurtrissures des poissons genre morue et celles qui se développent au contact de résidus de foie qui restent parfois lorsque la cadence rapide de travail amène à négliger les détails.

Il ne faut pas confondre l'altération qui vient d'être décrite avec le jaunissement de la chair de morue le plus souvent observée lorsqu'on utilise un sel relativement pur en NaCl. Ce type de jaunissement ne représente aucun risque sanitaire

- Les taches brunes

Une autre altération de couleur est l'apparition de nombreuses petites tâches brunes (comme « poivré ») ou fauves particulièrement remarquables sur le côté de la chair salée. Cette altération n'est pas dangereuse, elle n'entraîne ni goût ni odeur mais elle donne un aspect désagréable rendant le produit non commercialisable. Il s'agit

d'une moisissure présente dans les sels des marais salants, le *Sporendonema epizoum*, véritable halophile et osmophile aérobie exigeant 5 à 10 % de sel pour se développer mais capable de supporter beaucoup plus. L'optimum se situerait vers 10 à 15 % de sel, une humidité relative de 75 % et une température de 25 à 30 °C. Certaines souches sont protéolytiques. Toutefois le plus souvent elles ne décomposent pas le poisson.

- Les taches blanches

Des tâches blanches de cristaux de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ ont été observées sur la morue salée. Elles proviennent probablement de la dégradation enzymatique des nucléotides. Il ne semble pas y avoir de modifications du goût et de l'odeur. Seul l'aspect des tâches est déplaisant. La cause serait l'utilisation d'un sel trop sec et d'un poisson à pH légèrement alcalin indiquant une contamination initiale. La formation des cristaux de phosphates n'implique pas une altération préalable de la chair. On les trouve juste sous la surface salée ou au-dessus de celle-ci selon les conditions de déshydratation après salage. La formation externe concerne donc plutôt le poisson salé-séché que le poisson salé.

- Les autres altérations bactériennes

La mise au point de conditionnements en matière plastique (les films transparents pour le commerce de détail), la généralisation de la vente des produits salés en comptoirs réfrigérés ont conduit les industriels à réduire l'intensité de leurs traitements conservateurs, ce qui leur a permis simultanément de satisfaire les goûts de la clientèle. Le consommateur actuel, en effet, quel que soit le domaine alimentaire d'ailleurs, n'aime plus les goûts forts, très « personnalisés » comme le hareng saur. Il s'ensuit une baisse la qualité bactériologique depuis 25 ans. La présence d'entérocoques est devenue fréquente, de même que celle des levures, par contre celle des staphylocoques pathogènes diminue. Dans les anchois salés, souvent plus dessalés qu'autrefois avant la vente, on trouve occasionnellement des spores de *Clostridium* qui n'étaient pas décelés autrefois quand les produits étaient plus salés.

La contamination par les anaérobies sulfitoréducteurs tels que *Clostridium perfringens* toucherait la quasi-totalité des préparations d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) : approximativement les trois quarts des filets d'anchois au vinaigre, les trois quarts des anchois au sel, les deux tiers des filets d'anchois à l'huile. Mais dès que la teneur en sel dépasse 6 %, ces germes ne prolifèrent plus, ils sporulent. Cette salinité est atteinte après environ 12 heures de salage. Après 15 jours de saumurage, la salinité très forte (16 % de sel dans la phase aqueuse), le ϕ de 5.3 et l' A_w de 0.75 font de l'anchois un aliment acide du type dit à « humidité intermédiaire ». Les spores survivent mais ne germent pas et on ne décèle pas d'entérotoxines

Assez surprenante est la survivance temporaire parfois constatée de *Salmonella* pendant le salage, mais celle-ci disparaît dès que l' A_w tombe en dessous de 0.9.

Certaines espèces de bonites deviennent toxiques par formation d'histamine et autres amines toxiques dues à l'action bactérienne. Cette contamination a, en fait, surtout été décelé dans des sauces de poisson fermenté. Elle pourrait exister dans des bonites salés en tranches, produit fabriqué et apprécié en Turquie (71).

Tableau XIV – Barème de cotation du poisson : indice d'altération. D'après Rozier J.(68).

a – 2 – 2 les viandes salées

- La qualité des viandes salées dépend en grande partie de l'intervention d'une flore lactique et dénitrifiante convenable. Des microbes indésirables peuvent néanmoins provoquer des défauts de fabrication ou des altérations.

Pour les pièces salées crues, jambon «sel sec» en particulier, le principal défaut est la putréfaction profonde ou puanteur d'os, trop fréquente encore malgré les précautions prises. Certaines années cet incident peut intéresser jusqu'à 7 % des jambons mis en œuvre. L'odeur est décelée à l'aide d'une sonde en bois ou en acier inoxydable plongée à proximité de la région coxofémorale, puis portée rapidement près des narines. Les zones profondes sont grisâtres, brunâtres, ramollies et à odeur rance, alliée. Des zones sphériques de petite taille, de 1 à 2 cm de diamètre, peuvent présenter une couleur brune ou grise et une odeur butyrique légère. Il faudra s'en méfier : il peut s'agir du développement d'une Clostridie... en particulier *Clostridium botulinum*.

Une fois salé, le jambon sec est stable. Cependant, il peut rancir en surface comme en profondeur, il peut également se recouvrir d'un enduit visqueux à odeur caséuse, surtout dans les zones non-grasses, à proximité de la tête fémorale ou dans la fente de désossage. Des moisissures de couleurs variées peuvent cacher totalement la surface de leur chevelure feutrée ou ouatée abondante.

- Pour les pâtes salées crues, le poissage à odeur caséuse peut apparaître rapidement.

- Pour les pâtes salées fermentées, les saucissons secs d'une manière générale, le principal défaut de fabrication d'origine microbienne est la putréfaction. La mise en œuvre de viande avariée en est l'origine essentielle. L'étuvage à 20 – 24 °C pendant 24 à 48 heures déclenche l'apparition de l'odeur forte, putride et de la coloration brune. Le cœur du saucisson reste mou.

Une fois séché, le produit est considéré comme stable. Il peut, comme le jambon sec, se recouvrir d'un enduit bactérien visqueux ou de moisissures inhabituelles et différentes de celles qui devraient constituer la «fleur». L'odeur peut devenir caséuse.

Pour les pièces salées cuites, jambons blancs surtout, les défauts de fabrication d'origine microbienne sont nombreux. Lorsque le saumurage reposait sur une activité bactérienne (jambon d'York, jambon au torchon), il était possible d'observer des défauts de couleur, les nitrates étant trop ou pas assez réduits par une flore inadaptée qui ne conférait pas à la viande sa couleur rouge stable par formation de nitrosomyochromogène en quantité suffisante. Le muscle après cuisson acquérait une couleur grise ou brune. Un autre défaut bien connu et encore fréquent est le jambon écumeux. Des minuscules logettes sphériques se forment dans un jambon à odeur prononcée, souvent agréable. Leur paroi renferme une substance translucide brillante. Une tranche de jambon apparaît perforée de très nombreux trous ronds. Cet accident fait suite à l'emploi de saumures riches en bactéries protéolytiques et à un long égouttage précédant la cuisson. Le jambon blanc peut également être le siège d'une putréfaction sulfhydroammoniacale.

Une fois cuit, le produit est considéré comme périssable, il peut se recouvrir d'un limon visqueux à odeur caséuse. Des tâches vert clair, vert pistache, superficielles ou profondes, peuvent envahir les sections. Elles présentent un caractère contagieux : par contact il est possible de les transmettre d'un morceau à un autre. Lorsque le jambon est présenté en pièce ou en tranches sous vide, une substance blanchâtre à odeur lactique se développe parfois entre la surface des tranches et la pellicule.

- Les pâtes cuites sont le siège de diverses altérations : sùrissement, moisissures superficielles, limon, tâches vertes, sont les plus courantes (9).

De manière générale les matières premières entrant dans la composition des produits de charcuterie et de salaison sont nombreuses : il y a surtout la viande et les abats de porc, mais aussi d'autres espèces de boucherie, de volailles, de gibier à poils et à plumes, voire maintenant de poisson. Les autres ingrédients sont nombreux : légumes, gélatine, amidon, lait, œuf, sel, épices, etc.

Les contaminations sont multiples et inévitables quelles que soient les précautions prises par les charcutiers qui, en principe, sélectionnent les denrées les plus fraîches et les plus propres. Ainsi, le commerce fournit des épices stérilisées, du sel purifié. Restent les problèmes relatifs aux viandes et abats (68).

a – 2 - 3 Les crustacés

Le principal caractère de fraîcheur est la persistance de la vie. L'altération microbienne sur les animaux morts se traduit par le développement d'un enduit visqueux qu'il est possible d'apprécier, pour les crevettes par exemple, par la facilité d'écoulement d'une poignée sur la paume de la main inclinée, le limon formé freinant le glissement des crevettes entre elles. Par la suite la putréfaction ammoniacale intéresse la chair ; elle s'accompagne d'un noircissement progressif des branchies et des tissus fibreux constitutifs des ligaments intersegmentaires de la carapace.

a – 2 - 4 Les mollusques

Les coquillages s'achètent vivants. Dans d'autres pays le corps est extrait de la coquille et vendu en l'état ou congelé. Après la mort, les coquillages s'acidifient avant de se putréfier. Les mollusques céphalopodes subissent par contre une putréfaction sulfhydroammoniacale rapide.

b – Mécanismes des altérations

Les micro-organismes provoquent les altérations par leur présence physique et par leur métabolisme.

b – 1 Par leur présence physique

Quand les bactéries deviennent assez nombreuses en surface elles sont visibles : c'est le limon. Le «poissage» débute à partir de 10^8 germes par cm^2 , le limon forme un revêtement continu à partir de 10^9 . Ce nombre est voisin du maximum. Les moisissures agissent de la même façon.

Si le nombre de germes initialement présents est supérieur à $5 \cdot 10^6$ par cm^2 le limon ne se formerait pas ; par contre si ce nombre excède $9,3 \cdot 10^7$ il y aurait formation de limon de façon systématique (26).

En profondeur, les bactéries ne sont pas visibles.

b – 2 Par leur métabolisme

Le catabolisme de micro-organismes aboutit, quel que soit le constituant concerné, à la libération de substances très variées, solubles dans l'eau, volatiles et gazeuses qui confère à l'aliment une odeur parfois facile à rapporter à une substance simple : NH_3 , SH_2 , acide butyrique, mais le plus souvent complexe pour laquelle les termes pour en désigner la qualité sont imprécis et difficile à choisir, même à titre de comparaison : odeur fécaloïde, méphitique, d'égout, de paille, de poisson, de souris, de rance, d'oxydé, de linge mal séché, de relent, etc.

Les protéines de structure pouvant être atteintes, la consistance des tissus est modifiée, surtout en présence d'un dégagement gazeux interne.

La couleur est souvent modifiée : les pigments de la viande sont sensibles aux produits de dégradation.

La myoglobine au contact de SH_2 donne dans certaines conditions la sulfomyoglobine, pigment vert. Quelques Lactobacilles, en particulier *Lactobacillus viridescens* dans les viandes salées cuites, produisent de faibles quantités de peroxydes non détruites faute de catalase microbienne ou tissulaire, cette dernière étant détruite par la cuisson. Les peroxydes agissent sur le nitrosomyochromogène pour donner une porphyrine oxydée verte. Enfin, la dénaturation de la myoglobine en metmyoglobine explique la coloration brune des viandes sièges de putréfaction profonde.

Le mélanosis, c'est à dire le noircissement des carapaces des crustacés est particulier. Le pigment est une mélanine formée à partir de la tyrosine par action d'une tyrosinase microbienne (polyphénol-oxydase). La tyrosine est séparée précocement des chaînes peptidiques par les microbes. Est à rapprocher de ce phénomène l'apparition de cristaux de tyrosine dans certaines viandes congelées ou salées alors qu'elles étaient au premier stade de putréfaction. Cette altération est connue sous le nom de «putréfaction hydrolytique».

L'anabolisme des micro-organismes peut aboutir à la formation de substances complexes :

- polysaccharides dont les mucopolysaccharides : dextranes, levanes et amylose responsable du caractère visqueux de certains limons, ou du caractère filant de laits ou de saumures avariées. Les germes responsables sont : Streptocoques, *Leuconostoc*, Coliformes, *Bacillus*.
- Pigments diffusibles : ceux des *Pseudomonas* du groupe 1 de Schewan c'est à dire la pyocyanine bleue et la fluorescéine verte dans certains laits et œufs altérés.
- Pigments non diffusibles : jaune à doré : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Flavobacterium* ; bleu violet : *Chromobacterium* ; rouge : *Serratia*, etc.

c – Facteurs des dégradations

c – 1 Les micro-organismes

- Les espèces en présence

Il s'agit en l'occurrence des agents responsables des altérations. Mais les espèces en présence vont déterminer l'allure des modifications.

Pratiquement, tous les germes utilisent les sucres, mais à des degrés divers et selon des voies métaboliques variées. Il a été dit que la production d'acide lactique était prédominante pour les ferments lactiques. Les coliformes, en présence de sucre, acidifient d'abord le milieu, puis en utilisant les substances azotées et en produisant NH_3 , le neutralisent puis l'alcalinisent (germes pseudo-lactiques). Cette première phase acidifiante est celle qui intervient dans le faisandage.

Le pouvoir protéolytique varie beaucoup dans le monde microbien, depuis les ferments lactiques qui n'utilisent que discrètement les acides aminés jusqu'aux Clostridies qui sont capables d'attaquer toutes sortes de protéines y compris le collagène. Les bacilles Gram négatif sont généralement faiblement protéolytiques. Des substances azotées non protéiques leur suffisent. Parmi les germes de contamination les plus banals, les genres *Proteus-Providencia* sont ceux qui utilisent le mieux les protides.

Ce sont les conditions de la production, de la préparation, du stockage, des transformations qui vont déterminer la nature des contaminations. Les contaminations d'origine endogène caractérisent assez bien un type d'aliment. Les micro-organismes du tube digestif varient d'une espèce animale à l'autre, surtout lorsqu'elles sont très dissemblables, appartenant à des embranchements et des classes différentes : Mollusques, Crustacés, Poissons, Oiseaux, Mammifères. Certaines familles microbiennes sont fréquentes : Entérobactéries, Streptocoques, Lactobacilles, Clostridies, Levures. Les contaminations d'origine exogène ont des points communs dans tous les secteurs : germes d'origine hydrique au sens large, surtout *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, etc. ; germes apportés par l'air : les spores des *Bacillus* et des moisissures ; germes d'origine tellurique : Clostridies.

Malgré cette diversité il faut reconnaître l'existence d'un microbisme d'atelier qui s'explique par la nature des produits traités qui apportent les mêmes germes et la constance des conditions physico-chimiques qui jouent un rôle sélectif. C'est pourquoi si du point de vue qualité ce microbisme est fructueux (variétés de jambons secs, de saucissons secs, de fromages), il n'est pas rare non plus de voir se répéter les mêmes accidents de fabrication ou se reproduire les mêmes altérations jusqu'à ce que des mesures soient prises pour enrayer ces défauts (9).

les micro-organismes en cause

- $0.98 < A_w < 1$

La plupart des micro-organismes retrouvés dans l'alimentation ont des optimum de croissance supérieurs à 0.98. Bien que pour beaucoup le taux de croissance demeure important pour $A_w = 0.98$, d'autres sont fortement inhibés à cette valeur

Pour les produits protéiques, notamment le poisson et la viande, maintenus à température ambiante, *Pseudomonas spp.* représente un agent de dégradation majeur. Ce dernier est à l'origine de la production d'amines volatiles, de sulfure d'hydrogène et d'esters d'acides organiques. En anaérobiose, les bactéries lactiques (acide) prédominent.

L'adjonction de sel en faible quantité sur de la viande suffit à entraver la croissance de *Pseudomonas* dont la limite minimale se situe vers 0.97.

- $0.93 < A_w < 0.98$

Les bactéries Gram – sont vite remplacées par des Gram + : *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae* bien que les Coliformes halotolérants peuvent être retrouvés en nombre important. Jusqu'à $A_w = 0.97$, les lactobacilles peuvent être dominants, mais en dessous de cette valeur les microcoques se développeraient majoritairement.

- $0.85 < A_w < 0.93$

La dégradation des denrées est essentiellement due à des bactéries Gram positif (les Cocci sont prédominants), des levures et des moisissures.

- $0.60 < A_w < 0.85$

Les champignons xérophiles et les levures osmophiles sont prédominants à ces valeurs de A_w ... Les moisissures peuvent se développer en présence d'oxygène et les levures fermentaires peuvent spolier les parties internes des produits. Les produits fortement salés comme le poisson sont, en présence d'air, susceptibles de subir une attaque protéolytique par des bactéries halophiles extrêmes ; ils peuvent aussi être colonisés par la moisissure *Wallemia sebi* à l'origine de modification de saveurs.

- $A_w < 0.60$

Aucun micro-organisme ne peut se développer (1).

Le nombre initial de microorganismes

Plus la contamination initiale est élevée, plus rapidement apparaissent les premières modifications : la contamination initiale détermine la durée commerciale d'une denrée alimentaire

Dans certains cas la contamination initiale peut être constituée d'une seule espèce. Son métabolisme déterminera les caractères de l'altération. C'est le cas le plus souvent du sùrissage anaérobie des viandes, de la putréfaction des œufs et du bombage des conserves par des germes thermorésistants.

Cependant, cette contamination initiale faible ou importante est généralement constituée d'une grande variété d'espèces microbiennes. Or, au cours des jours ou semaines suivantes, une ou plusieurs espèces vont prédominer et, arrivées au bout de leur possibilité de développement, elles laisseront leur place à d'autres, etc....(9)

c – 2 Le type de l'aliment

Les caractéristiques de l'aliment sélectionneront les espèces initialement dominantes et influenceront les métabolismes. Bien entendu, là encore l'Aw et le pH de l'aliment joueront un rôle majeur au même titre que sa composition chimique.

- La composition

Les aliments d'origine animale sont dans presque tous les cas un mélange de trois types de composants : hydrates de carbone, lipides, substances azotées. De l'un à l'autre les proportions varient.

Lorsque les sucres dominent, la tendance à la fermentation lactique, à l'acidification sera forte. Les aliments deviennent aigres : c'est le cas du lait, de certains produits de charcuterie amylacés ou sucrés, de mollusques bivalves.

Lorsque les hydrates de carbone existent, même en petite quantité, les germes qui se développent les épuisent en premier lieu sans manifestation apparente avant de s'attaquer aux substances azotées non protéiques. C'est cette seconde phase qui se traduira par l'apparition d'odeurs anormales juste avant que n'apparaisse le limon : c'est le cas de la viande. Dans ce cas, en réfrigération, l'odeur de relent n'apparaît que lorsque le nombre de germes par cm² a dépassé 10⁷ à 10^{7,5}.

Dans les viandes à coupe sombre, la quantité d'hydrates de carbone est minime voire quasiment nulle. Les germes qui sont dominants sont les mêmes (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*), mais ils s'attaquent rapidement aux substances azotées relativement abondantes. L'odeur anormale apparaît rapidement quand la flore dépasse 10⁶ à 10⁷ germes par cm², bien avant que n'apparaisse le limon.

Sur les surfaces grasses ou aponévrotiques des carcasses les conditions sont les mêmes que pour les viandes à coupe sombre. Pour les poissons entiers, la peau protège le muscle et les germes du genre *Pseudomonas* se développent en l'absence quasi-totale d'hydrates de carbone et avec une faible proportion de substances azotées. La chair du poisson est très pauvre en hydrates de carbone mais très riche en substances

azotées. Les filets sont donc très sensibles. Il en va de même pour les mollusques céphalopodes. L'altération est souvent rapide car la contamination initiale est généralement forte. La présence d'oxydes de triméthylamine transformé en triméthylamine et la formation de mercaptan, de diméthylsulfure et de SH₂ caractérisent l'odeur produite.

c – 3 L'environnement

Il convient de repréciser l'importance des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, l'humidité de l'air ou la composition gazeuse de l'atmosphère (9).

2 – Altérations recherchées : la maturation

a – A partir de la flore originelle : exemple du poisson

La maturation fait suite au salage proprement dit, elle provoque des modifications chimiques et physico-chimiques des tissus. L'essentiel en est le fractionnement des molécules de protéines. La perte de certains composés azotés solubles en début de salage est compensée par la formation d'autres composés solubles qui peuvent d'ailleurs comprendre les mêmes entités chimiques. Elle est presque la même que dans le poisson frais. Pendant le salage, le transfert de matière dans le biosystème concerne principalement la migration des molécules de sel ; pendant la maturation, des substances azotées (surtout de poids moléculaire peu élevé) ainsi que des matières grasses diffusent du poisson vers la saumure. La texture du poisson est affectée, le tissu musculaire s'amollit et des arômes et goûts, appréciés de certains consommateurs, apparaissent, résultant de divers processus schématisés figure 36 page 79.

a – 1 Les agents de la maturation

La maturation est l'œuvre des enzymes tissulaires et (ou) digestives du poisson, des enzymes bactériennes et des actions fermentatives des bactéries. Précisons que la prépondérance de l'une ou l'autre actions (autolyse enzymatique, actions bactériennes) est très controversée, certains prônant celle des enzymes digestives, d'autres montrant qu'elles ne sont pas nécessaires à la maturation, tous s'appuyant sur des essais fort convaincants de cas...spécifiques particuliers. Il faut simplement tirer de ces observations que les maturations sont multiples ; qu'elles dépendent de la composition chimique initiale du poisson (et naturellement de l'espèce), de la composition du sel employé et de sa flore, de la température, de la composition de la saumure, de la teneur en sel des chairs (salage léger ou fort), des conditions d'anaérobiose etc....

Concernant le rôle des enzymes dans la maturation, on admet un processus autolytique. Les enzymes tissulaires sont d'abord les plus actives, les enzymes préparent la voie à l'activité bactérienne. Cette protéolyse est l'œuvre des cathepsines. Toutefois intervient la teneur en sel puisque les exopeptidases (cathepsines) des muscles seraient plus facilement inhibées par le sel que les endopeptidases digestives. Les partisans de la maturation par voie autolytique l'attribue surtout, voire exclusivement, aux enzymes digestives bien que, même en solution saturée, les

cathepsines conservent une activité décelable. Cette théorie enzymatique ne laisse aux micro-organismes qu'un rôle insignifiant à jouer.

Toutefois, le hareng salé acquiert considérablement plus d'odeur et de goût en saumure naturelle qu'en saumure artificielle souvent renouvelée. Ceci indique aussi bien :

- que le substrat (saumure), enrichi par les substances azotées qui ont diffusé vers lui, est propice à la croissance bactérienne,
- que la saumure venant d'un premier salage, qui est ajoutée dans les fûts, contient assez d'enzymes pour démarrer la maturation qui libère davantage d'enzymes ensuite.

Le salage immédiatement après la pêche diminue le nombre de micro-organismes et les germes protéolytiques à ce stade disparaissent souvent complètement (figure 37 page 79). Dans le salage en barils, aussi bien que dans les semi-conserves, le nombre de micro-organismes reste faible pendant plusieurs semaines : 2 à $9 \cdot 10^3$ par ml de saumure environnante, ou jusqu'à 20^3 dans la saumure naturelle. La flore originelle (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*) psychrophile et protéolytique disparaît au profit d'une flore plus fermentative que protéolytique. Celle-ci commence à augmenter de nombreuses semaines après fermeture des conteneurs : barils ou autre. Pendant le troisième mois le dénombrement s'est élevé aux environs de $10 \cdot 10^6$ par ml, le pH s'est abaissé vers 6.5 (pH : 5 au cinquième mois) dénotant une fermentation avec formation d'acides. Cette flore peut être répartie en trois groupes :

- Groupe 1 : Cocci Gram +, catalase +, isolés ou en groupes (*Micrococcaceae*) halophiles ; certaines souches sont à l'origine d'odeur agréables. Ce sont les microcoques qui sont responsables de la flaveur et de l'arôme, de la morue salée de Gaspée.
- Groupe 2 : Cocci Gram +, catalase -, isolés par paires (Diplocoques) ou par tétrades (Pediocoques). On a isolé des *Lactobacillaceae* genre *Pediococcus* : *P. cerevisiae* plutôt en milieu neutre et *P. halophilus* en milieu acide. Les pediocoques sont microaérophiles et homofermentatifs, ils ne donnent pas de gaz mais augmentent l'acidité.
- Groupe 3 : Bâtonnets Gram +, catalase -, souvent enchaînés courtes ou longues.

Mais il peut y avoir une contamination par des lactobacilles : *Leuconostoc* (*L. buchnerii*, *L. brevis*). Le *L. mesenteroïdes* rend visqueux le fluide environnant et des gaz sont formés, essentiellement CO₂.

Si le rôle attribué aux micro-organismes reste «léger», s'ils ne jouent pas le rôle central, ils peuvent être très importants pour constituer les arômes du produit mûr arômes et flaveurs provenant du sucre ajouté ou des amino acides libérés, mais ce sont alors des semi-conserves et non, seulement, des poissons salés.

a – 2 Biochimie sommaire de la maturation

Au cours de la maturation, les modifications les plus évidentes concernent les protéines : accroissement de la teneur en aminoacides libres et d'autres formes de NPN en même temps que l'aspect, la consistance de la chair, l'odeur, le goût évoluent différemment selon que les poissons sont maigres ou gras. La figure 38 page 79 montre l'évolution biochimique des composés azotés au cours de la maturation. Pendant une première phase, la solubilité des protéines diminue fortement, surtout celle des protéines solubles à force ionique élevée (actomyosine). L'insolubilité de l'actomyosine (dénaturée par la haute teneur en sel) à ce moment rend le poisson plus dur et sec. Puis la dégradation progressive de l'actomyosine conduit à des petits peptides et des aminoacides solubles à faible force ionique (courbe 2). Ces composés solubles comprennent, à côté d'une fraction protéique (courbes 3 et 5), une fraction non précipitable par l'acide trichloracétique qui augmente avec le temps (courbe 6). La teneur en azote aminé augmente également (courbe 7). Une partie de ces fractions azotées solubles diffusent dans la saumure si bien que la teneur en azote dans le poisson égoutté baisse (courbe 8). Le poisson salé en baril contient presque tous les aminoacides totaux suivants du poisson frais : THR, GLY, ILE, LYS, CYS, TRY ; il y a plus de PRO et de PHE et moins de certains autres aminoacides que dans la chair de poissons frais. Concernant les aminoacides libres on observe une légère diminution lorsque le poisson ramollit légèrement sans doute en raison de l'accroissement de l'activité bactérienne à ce moment qui dégrade les aminoacides (71).

Figure 36 - La maturation des poissons marinés ou salés.
D'après Shewan J.M. (Sainclivier (71))

Figure 37 – Dénombrements bactériens dans la saumure de harengs salés.
D'après Sikorski Z.E. (Sainclivier (71))

Figure 38 – Azote total et différentes fractions azotées solubles dans les filets de harengs au cours de la maturation (valeurs exprimées en % de la teneur en azote du hareng à l'emballage).

D'après Alan F. (Sainclivier (71))

b – Par ajout de micro-organismes : les «starter cultures »

La maturation est également recherchée pour les produits carnés. Celle-ci peut s'effectuer à partir de la flore originelle mais peut également être réalisée (initiée) par une flore «exogène » : les « starter cultures ».

b – 1 Viandes crues salées présentant une forte Aw

Cette catégorie comprend différents types de saucisses à court délai de péremption : par exemple des produits semi-finis comme la « Bratwurtz » allemande qui nécessitera un chauffage avant consommation ou d'autres saucisses fermentées pouvant être consommées telles quelles. La fermentation peut soit être naturelle (c'est à dire à partir de la flore présente dans le produit sélectionné par salage) soit être réalisée par une flore additionnée (starter cultures). Disponibles dans le commerce, ces dernières sont constituées de types de bactéries isolées à partir de saucisses subissant une fermentation naturelle. Ce sont des germes Gram + comme *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, lactobacilles hétéro ou homofermentaires, streptobactéries ainsi que des levures (*Debaryomyces kloeckeri*). Peuvent également être ajoutés des micro-organismes absents de la viande mais recherchés pour leurs effets digestifs (*Lactobacillus acidophilus*). La fermentation des hydrates de carbone quel qu'en soit la source aboutit à la formation d'acide et à une baisse du pH. Toutefois la formation d'acide est insuffisante pour l'obtention de l'arôme désiré. C'est surtout l'activité lipolytique qui, par la formation de carbonyles, conduit aux arômes recherchés. D'un autre côté, de fortes concentrations en sel et un pH bas inhibent ces activités.

b – 2 Viandes crues salées à faibles Aw

Dans cette catégorie les produits finis ont un pH de 5.8 à 6, une concentration en saumure de 13 à 16 %, ce qui correspond à 25-28 % d'eau et à 3.5-5.5 % de sel. Le salami hongrois est obtenu après une longue et lente maturation ; sa composition est d'environ 28-30 % d'eau, 19.5 % de protéines, 47 % de gras et 4-4.4 % de sel. Le pH est de 5.9-6.2 mais peut monter jusqu'à 6.5. Il est recouvert d'une couche de moisissures lui conférant sa saveur caractéristique.

Le « *bündener Fleisch* » Suisse est constitué de bœuf lentement salé puis séché. Son Aw est de 0.88. On retrouve dans cette catégorie le biltong africain (Aw =0.6), le jambon fermier Nord américain...

Comme précédemment la maturation est naturelle ou initiée par des starter cultures (lactobacilles, *Pediococcus*) (2).

IV – LE SEL COMME BIOTOPE D’INTERET INDUSTRIEL

Bien entendu, les mers et océans sont peuplés de nombreux micro-organismes aptes à proliférer en milieu salé. Cependant nous nous limiterons à l’étude des Halobactéries, qualifiées de bactéries extrêmes, qui peuplent de façon quasi exclusive les marais salants, les lacs salés, les mines de sel, ... où la salinité peut être bien supérieure à celle des océans.

A – UNE DIVERSITE MICROBIENNE

1 – Les Halobactéries

C’est à partir des années 1920 que se sont développées, notamment en France, les recherches microbiennes sur la contamination du poisson salé provoquant des taches roses ou brunes dans la chair. Les taches roses étaient l’œuvre de bactéries halophiles, les brunes celles de moisissures halotolérantes. De nombreuses publications orientées vers l’élimination de ce type de contamination (nettoyage des locaux – maintien de la température en dessous de 5 °C) parurent en provenance de différents laboratoires à travers le monde pendant les années 30. C’est ainsi que l’on a découvert que les micro-organismes responsables provenaient du sel des marais salants. C’est à partir de ce moment que les recherches microbiologiques se sont développées en milieux hypersalés.

Les différentes bactéries extrêmement halophiles découvertes ont été regroupées en un ordre, les Halobactérales appartenant aux Archéobactéries.

a - Caractéristiques générales

Ces bactéries sont connues pour contenir des cytochromes et des ferredoxines. La structure de ces ferredoxines serait étroitement apparentée à celle des cyanobactéries à l’exclusion de toutes les autres bactéries mais il paraît peu vraisemblable que ces homologues puissent refléter une parenté phylogénétique. Les bactéries halophiles ont besoins de concentrations élevées de sel pour survivre ; certaines se développent facilement dans les saumures. Leur prolifération dans les milieux salés comme le grand lac salé ou la mer Morte, a été souvent décrite. Elles donnent une coloration rouge aux marais salants et produisent des altérations et des décolorations du poisson salé (45). Actuellement leurs particularités physiologiques suscitent un grand intérêt.

- Bâtonnets, coques de formes très variées allant du disque au triangle
- Non mobiles ou mobiles grâce à des cils ou un flagelle polaire
- Gram + ou Gram –
- Aérobie ou anaérobie facultatif avec ou sans nitrate

- Une concentration minimale de 1.5 M de NaCl est nécessaire pour la croissance, la plupart des souches ayant un optimum de croissance entre 3.5 et 4.5 M de NaCl.
- Les colonies de formes très variées sont rouges en raison de la présence de caroténoïdes (C₅₀), la bactériorubérine étant le pigment prédominant. Ces caroténoïdes semble jouer un rôle protecteur vis à vis du très vif rayonnement solaire rencontré dans les lacs salés (comme le grand lac salé, la mer Morte ou les lacs salés de l'est africain) et les marais salants (Dundas et Larsen d'après Staley J.T. *et al.* (72)). La présence de pigments « rétinien » permettant des mouvements ioniques à travers la membrane cellulaire semble être une constante chez ces bactéries. Un de ces pigments, la bactériorhodopsine, joue le rôle d'une pompe à proton gouvernée par l'énergie lumineuse. Les organismes possédants ce pigment particulier exploitent le gradient de protons généré pour la synthèse d'ATP.
- La température optimale de croissance se situe entre 35 et 50 °C
- Chimioorganotrophes, ces micro-organismes utilisent les acides aminés ou les hydrates de carbone comme source de carbone.
- On note la présence d'une ARNase du type ABB''C
- Osmorégulation par accumulation intracellulaire de grandes quantités de KCl.
- L'ADN est formée d'un composant majeur et d'un composant mineur représentant 10 à 30 % de l'ADN total. Les souches munies de ce composant mineur possèdent généralement un important plasmide de plus de 100 kilobases. Le pourcentage de G + C du composant majeur est de 61 à 71, celui du composant mineur de 51 à 59.
- Les Halobactéries montrent une résistance vis à vis des inhibiteurs classiques (des Eubactéries) tels que la Pénicilline et le Chloramphénicol .

b – Les Archéobactéries se distinguent des autres types cellulaires

b – 1 Aspect phylogénique

La façon la plus simple de découvrir l'histoire d'une cellule est l'étude de ses séquences génétiques. Les produits des gènes donnent aussi des indications sur les relations bactériennes. A cet égard, l'ARN des ribosomes, où l'information génétique est traduite en protéines, et qui a été particulièrement bien conservé au cours de l'évolution, représente un polymère d'intérêt remarquable. C'est la comparaison des dictionnaires de ces ARN (ARN_{16S}) telle qu'elle a été définie par Woese et Fox depuis 1977 qui a permis à ces auteurs de découvrir les archéobactéries. Ces micro-organismes ne rentreraient pas dans le groupe phylogénétique défini par les autres bactéries (figure 39 page 84); ils constitueraient une ramification évolutive, largement antérieure à l'ancêtre commun de toutes les vraies bactéries. L'apparition de ce groupe distinct remonterait à environ $3,5 \cdot 10^9$ années (19). Ils se rapprocheraient aussi bien des eucaryotes que des eubactéries d'où la proposition d'envisager deux règnes chez les procaryotes, celui des *Eubacteria* et celui des *Archeobacteria* (45).

On distingue parmi les archéobactéries trois grandes lignées :

- Les *Crenarchaeota* : principalement hyperthermophiles
- Les *Euryarchaeota* : méthanogènes, halophiles, *Thermoplasma* et *Archaeoglobus*
- Les *Korarchaeota* (18)

b – 2 Particularités structurales

b – 2 - 1 Paroi cellulaire

- Bactéries : peptidoglycanes
- Archéobactéries : pseudo-peptidoglycanes ou uniquement protéique. La paroi des archéobactéries ne contient jamais de mucopeptides caractéristiques des eubactéries ; elle s'en rapproche dans certains cas mais le polysaccharide constitutif est toujours exempt d'acide muramique.
- Eucaryotes : végétaux (polysaccharides), animaux (absence), champignons (chitine) (54)

b – 2 - 2 Membrane cellulaire

Chez les bactéries et les Eucaryotes, les lipides membranaires correspondent à des chaînes aliphatiques linéaires d'acides gras reliées à des molécules de glycérol par estérification.

Chez les Archea, les lipides sont constitués de chaînes ramifiées d'hydrocarbure reliées au glycérol par des liaisons éther détectables par le procédé de Ross *et al.* et celui de Torreblanca *et al.* (d'après Staley J.T. *et al.* (72)). Ils possèdent une grande résistance mécanique, thermique, et aux fortes concentrations en sel.

Les lipides comprennent des éther de phytanyl ou de sesterterpanyl analogues au phosphatidiglycérol (PG) et au phosphatidiglycérol sulfate (PGS).

Toutes les halobactéries possèdent des noyaux lipidiques diphytanyl (C_{20}, C_{20}) glycérol éther ; certaines souches ont en plus des noyaux sesterterpanyl-phytanyl (C_{25}, C_{20}) glycérol éther (De Rosa *et al.* d'après Staley J.T. *et al.* (72)) et au moins une souche présente le noyau disesterterpanyl (C_{25}, C_{25}) glycérol éther.

Une famille de glycolipides et de glycolipides sulfatés est généralement présente. Ces glycolipides dérivent du mannosyl-glycosyl-diphytanyl glycérol par substitution de sucre ou de groupements sulfatés en position 3 ou 6 sur le résidu mannose (Kates d'après Staley J.T. *et al.* (72)). Ces glycolipides comprennent le tetraglycosyl éther sulfate (S-TeGD), deux triglycosyls diéther (TGD-1 et TGD-2) ainsi que deux diglycosyls diéther (DGD-1 et DGD-2).

La biosynthèse de ces « archeol » serait assurée par une multienzyme membranaire activée par de fortes concentrations en sel (4M) (40).

Figure 39 – Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de séquences d'ARN 16S

b – 3 Différences de biologie moléculaire

b – 3 - 1 organisation du génome

- Le génome des archéobactéries est en taille proche de celui des procaryotes.
- Le génome des archéobactéries méthanogènes présente une morphologie typique de celui des eubactéries : chromosome formé d'une unique molécule d'ADN circulaire d'environ 1.9 Mbp (à peu près 45 % de la taille du génome d'*E. coli*)
- On note la présence d'éléments extrachromosomique chez les archéobactéries. Il s'agit pratiquement toujours « d'ADN satellite » chez les halophiles (56). La présence de cet ADN extrachromosomique, essentiellement des éléments d'insertion appelés ISHs (51), est à l'origine d'une grande instabilité génétique. Ces ISHs sont responsable des forts taux de variabilité phénotypique. Cependant, ils sont de part leur structure et leur fonction comparables aux transposons (62).
- Une caractéristique génomique propre aux archéobactéries est leur teneur en G+C, qui peut varier de 28 à 68 mol%. Chez les halophiles extrêmes, cette teneur est toujours proche de 60 %, et peut atteindre 68 % (22).

b – 3 – 2 Réplication

- Les archéobactéries possèdent des ADN polymérases avec des séquences protéiques analogues à celles des eucaryotes, des virus eucaryotes et d'*E. coli*.
- Certaines possèdent une activité exonucléasique 3' – 5'
- Une polymérase / primase présentant une activité transcriptase reverse a été identifiée chez *Halobacterium halobium*.
- Des topoisomérases, des gyrases ainsi que endonucléases de restriction ont été identifiées chez les archéobactéries.

b – 3 – 3 Transcription

- Les archéobactéries possèdent des ARN polymérases complexes, formées de 14 sous-unités.
- D'après les séquences codant pour ces sous-unités, les archéa polymérases seraient plus proches de celles des eucaryotes que de celles des bactéries.
- Contrairement aux ARN polymérases d'*E. coli*, les ARN polymérases des archéobactéries sont comme celles des cellules eucaryotes incapables d'initier la transcription en l'absence de facteurs d'initiation.
- Les promoteurs possèdent une séquence riche en bases A-T (25 à 32 bp) en amont de la zone à transcrire (19).

b – 3 – 4 Organisation des gènes

- La structure primaire des archéoprotéines se rapprocherait plus des celles des eucaryotes que de celle des procaryotes.
- Les gènes contiennent des pseudo-opérons.
- Des introns ont été mis en évidence au sein des ARNr 23S, 16S et des ARNt d'archéobactéries.
- Divers arrangements géniques ont été observés pour les archéobactéries.
Les gènes codant pour la méthyl coenzyme M réductase et la bactériopsin en sont de bons exemples.

b – 3 – 5 Traduction

Les signaux de traduction sont proches de ceux présents chez les bactéries. On retrouve notamment chez les archéobactéries des régions de complémentarité entre l'extrémité 5' des ARNm et l'extrémité 3' des ARN 16 S (8).

b – 3 – 6 Clonage et expression

- Le clonage fait généralement suite à la purification des protéines par des méthodes classiques.
- L'expression chez des hôtes hétérologues se complique du fait des variations d'environnement interne et des différences qui existent sur les mécanismes traduction et post-traductionnels (15).

c – Classification des Halobactéries

L'étude des lipides polaires (chromatographie) ainsi que des expériences d'hybridation ARN 16S/ADN ont permis le regroupement des archéobactéries halophiles en 6 genres : *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natronobacterium* et *Natrococcus*.

Tableau XV - Caractéristiques des différents genres d'Halobactéries (72).

pH optimal de croissance compris entre 5 et 8				
Genres	<i>Halobacterium</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Halococcus</i>
Formes	Bâtonnets ou Pléomorphes ou Coccoïdes	Pléomorphes (triangles, carrés, disques)	Pléomorphes (tasse, disques)	Coccoïdes (quelque soit le milieu) en paires, tétrades ou en amas
Lyse en présence d'eau distillée	Oui	Oui	Oui	Non
Motilité	Flagelle polaire	Oui ou non	Oui	Non
Gram	-	-	-	-, quelques +
[Mg⁺⁺] optimale	Modérée 5 – 50 mM	Modérée 5 – 50 mM	Elevée 20 – 50 mM	
[NaCl] optimale	Halophiles extrêmes 3.5 – 4.5 M (jusqu'à 5.2)	2 – 3 M (max 5.2)	2 – 3 (max 5.2)	3.5 – 4.5
Température optimale	35 – 50	40 – 45	Environ 35	30 – 37
Lipides polaires	Triglycosyl sulfaté Tetraglycosyl diether	C ₂₀ , C ₂₀ dérivant du Triglycosyl diether TGD-2	C ₂₀ , C ₂₀ dérivant du Diglycosyl diether sulfate (S-DGD-1) Pas de Phosphatidylglycérol	C ₂₀ , C ₂₀ et C ₂₅ , C ₂₀ dérivant des PG, PGP, TGD-2, S- DGD-1
Sources de carbone et d'énergie	Chimioorganotrophes AA nécessaires (la plupart des souches sont protéolytiques)	Chimioorganotrophes AA non indispensables (acides produits à partir de sucres)	Chimioorganotrophes AA non indispensables (acides produits à partir de sucres)	Chimioorganotrophes
Mode fermentaire	AS, quelques AAF	AS ou AAF		AS
pH optimal de croissance compris entre 8.5 et 11 Faibles besoins en cation Mg⁺⁺ (< 1 mM)				
Genres	<i>Natronobacterium</i>		<i>Natrococcus</i>	
Formes	Bâtonnets en phase de croissance exponentielle Deviennent coccoïdes ensuite		Coccoïdes en amas irréguliers, en paires ou seuls	
Lyse en présence d'eau distillée	Oui		Exsudation transmembranaire mais pas de lyse	
Motilité	Oui ou non		Non	
Gram	-		Au moins quelques G ⁺	
pH optimal	Alkaliphiliques 8.5 – 11		Alkaliphiliques 8.5 - 11	
[NaCl] optimale	3.5 – 4.4 M		3.0 – 4.0 M	
Température optimale	35 – 40		35 – 40	
Lipides polaires	Absence de glycolipides C ₂₀ , C ₂₀ et C ₂₅ , C ₂₀ majoritairement ; C ₂₅ , C ₂₅ parfois		Absence de glycolipides C ₂₀ , C ₂₀ et C ₂₅ , C ₂₀	
Sources de carbone et d'énergie	Chimioorganotrophes		Chimioorganotrophes	
Mode fermentaire	AS		AS	

Les Halobactéries occupent des biotopes variés

Tableau XVI – Lieux d’isolement des souches d’*Halobacterium* (72).

<i>H. salinarium</i>	Produits protéiques fortement salés, sel solaire
<i>H. saccharovororum</i>	Salterns marins
<i>H. sodomense</i>	Mer morte
<i>H. trapanicum</i>	Sel solaire (Tripani, Sicile)
<i>H. denitrificans</i>	Salterns de la baie de San Francisco
<i>H. cutirubrum</i>	Poisson salé

Tableau XVII – Lieux d’isolement des souches d’*Haloarcula* (72).

<i>H. vallismortis</i>	Death valley	Statuts taxinomiques incertains
<i>H. hispanica</i>	Salterns marins en Espagne	
<i>Halobacterium marismortui</i>	Mer Morte	
<i>H. californiae</i>	Saltern californien	
<i>H. sinaitensis</i>	Sadka, mer rouge	
<i>Amoebobacter morrhuae</i>	Morue salée,	

Tableau XVIII – Lieux d’isolement des souches d’*Haloferax* (72).

<i>H. volcanii</i>	Mer Morte
<i>H. mediterranei</i>	Mer Méditerranée
<i>H. gibbonsii</i>	Salterns marins en Espagne

Halococcus morrhuae

Tableau XIX – Lieux d’isolement des souches de *Natronobacterium* (72).

<i>N. gregoryi</i>	
<i>N. magadii</i>	Lac salé Magadi au Kenya
<i>N. pharaonis</i>	
<i>Souche SP8</i>	Lac Magadi

Natrococcus occultus

2 – Virus et champignons

a – Virus

L'analyse au microscope électronique d'échantillons prélevés en mer Morte a révélé la présence en grande quantité de particules viroïdes. En octobre 1994, lors du déclin de l'efflorescence des bactéries halophiles, de 0.9 à 7.3×10^7 particules par ml ont été recensées sur les 20 mètres les plus superficiels de la colonne d'eau. Le nombre de particules viroïdes surpassait celui des bactéries d'un facteur 0.9 à 9.5 (4.4 en moyenne). Un grand polymorphisme a été observé montrant majoritairement des particules en forme de fuseau (les plus nombreuses), polyédrales ou encore effilées. De plus, des particules non identifiées ont été collectées, essentiellement des morceaux d'algues et des particules en étoile ressemblant à des virus. Les échantillons prélevés en 1995 se sont avérés moins riches en bactéries et en particules viroïdes ($1.9 - 2.6 \times 10^6$ et $0.8 - 4.6 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ en avril 1995), suivi d'un déclin très marqué pour les virus (moins de 10^4 ml^{-1} entre novembre 1995 et janvier 1996). Cela suggère que les virus pourraient être à l'origine du déclin des communautés d'archéobactéries en mer Morte, environnement exempt de protozoaires ou autres prédateurs (60).

L'étude réalisée par Guixa-Boixareu *et al.* suggère quand à elle une faible participation des virus à la régulation des populations de procaryotes (35).

b - Champignons

Diverses levures noires d'aspect polymorphe comme *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis*, *Trimmatostroma salinum*, *Aureobasidium pullulans* et *Cladosporidium spp.* ont été isolés d'environnements hypersalés ($3 - 30\%$ NaCl). Ces milieux hypersalés constitueraient la niche écologique naturelle de *H. werneckii*, *P. triangularis* et de *T. salinum* (36).

3 – Le sel : un biotope de plus en plus exploré

La connaissance de nouveaux micro-organismes halophiles suscite un intérêt croissant et les sites d'étude se multiplient (marais salants, mines de sel souterraines (70), océans,...). Le but des recherches est de comprendre les capacités d'adaptation à ces milieux extrêmes, d'explorer de nouveaux processus d'osmoadaptation et d'aider au réarrangement taxonomique de ces organismes dans la systématique bactérienne. Dans un premier temps, la biodiversité est estimée à partir de prélèvements afin d'isoler de nouvelles espèces. Puis, après extraction et amplification de quelques fragments d'ADN génomique (le plus souvent d'ADN_{16S}) les produits de purification de PCR peuvent être clonés dans deux vecteurs différents afin d'isoler des séquences indépendantes. Les gènes sont ensuite extraits des plasmides après digestion enzymatique par des enzymes de restriction puis migration sur gel.

De nouvelles espèces comme *Chromatium salexigens* (11), *Desulfovibrio halophilus* (12), *Thiocapsa halophila* (13) ou encore *Halogeometricum borinquense* (55) ont ainsi été décrites. De nouveaux virus sont également découverts. On peut par exemple citer la découverte récente du virus HS1 qui infecte spécifiquement *Haloarcula hispanica* (3).

Pour ce qui est de comprendre l'adaptation des souches isolées aux fortes salinités, les études peuvent concerner aussi bien la structure de la membrane lipidique que celle des protéines ou encore la lutte contre le stress osmotique.

B – LES ADAPTATIONS A LA VIE EN MILIEU HYPERSALE : UN PACTE MOLECULAIRE AVEC LE SEL

Toute cellule vivante, qu'elle provienne d'organismes unicellulaires primitifs ou fasse partie d'organes très évolués comme le cerveau, baigne dans une solution saline qui contient essentiellement du chlorure de sodium et renferme une concentration équivalente en chlorure de potassium. Plusieurs fonctions vitales (battements du cœur, la transmission nerveuse, etc...) dépendent étroitement des gradients de concentration en NaCl et KCl de part et d'autre de la membrane cellulaire. A faible concentration, le sel est donc indispensable au fonctionnement de la cellule. Mais à fortes doses il empêche la vie. Voilà pourquoi la salaison est traditionnellement utilisée pour conserver les aliments : la plupart des micro-organismes responsables de la pourriture ne peuvent se développer dans un environnement ultra-salin. En effet, une différence importante de concentration en sel entre l'intérieur et le milieu extérieur provoque la sortie de l'eau.

Trop de sel entraîne la mort des cellules : on pourrait donc légitimement s'attendre à ce que les milieux ultra-salins soient absolument stériles. Il n'en est rien. Des communautés de micro-organismes prolifèrent dans les territoires où le sel (essentiellement du chlorure de sodium) a été concentré par évaporation à la limite de sa solubilité (5 ou 6 M), soit plus de dix fois la concentration de l'eau de mer. Ces « microbes du sel » représentent la seule forme de vie possible dans les grands lacs salés de l'Ouest américain, le lac Rose au Sénégal, la mer morte en Israël, ou plus proche de nous dans les marais salants des côtes de France. Nul besoin d'être un microbiologiste pour s'apercevoir de la présence de ces micro-organismes : la plupart d'entre eux contiennent des pigments qui donnent à l'eau une spectaculaire couleur rose, orangée ou pourpre selon l'espèce.

Quelles stratégies emploient les organismes unicellulaires pour occuper cette frontière du vivant ? Les « halotolérants », principalement des bactéries et des algues unicellulaires, peuvent s'adapter à de très fortes concentrations en sel en fabriquant en grandes quantités des petites molécules, par exemple du glycérol, qui s'accumule à l'intérieur des cellules. Au final, la concentration de molécules dissoutes égale la concentration de sel dans le milieu extérieur. Dans ces conditions d'équilibre, l'eau ne s'échappe plus des cellules et les réactions chimiques ne sont pas inhibées. Lorsque la concentration extérieure en sel diminue, cette synthèse est stoppée et les cellules continuent à vivre normalement. Chez les halotolérants, nous avons donc affaire à un mécanisme adaptatif : la cellule se défend contre un environnement extérieur extrême par une modification de son métabolisme.

Contrairement aux halotolérants, les bactéries dites halophiles ont un besoin absolu de fortes concentrations en sel pour vivre. Quelles sont leurs adaptations ?

1 – Régulation de la pression osmotique et maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire

a - Régulation de la pression osmotique : accumulation de KCl

Une des caractéristiques les plus frappantes des halobactéries est leur absolue nécessité pour de fortes concentrations en NaCl. Bien que certaines souches se développent correctement à des concentrations en NaCl de l'ordre de 1.5 M, la plupart des souches présentent une croissance optimale pour des concentrations de 3.5 – 4.5 M et continuent à proliférer en solution saturée (5.2 M).

Pour compenser la pression osmotique du milieu hypersalé environnant, ces organismes accumulent essentiellement du KCl (jusqu'à 5 M), qui se trouverait majoritairement sous forme libre (17). L'osmoadaptation chez les *Halobacteriaceae* diffère donc de celle utilisée par la plupart des micro-organismes qui accumulent des solutés organiques comme des sucres, des polyols, des acides aminés ou leur dérivés respectif, ectoïnes et bêtaïnes. *Chromatium glycolicum* utilise du glycolate (14), *Desulfovibrio halophilus* du tréhalose et de la glycine bêtaïne (74), *Haloanaerobacter salinaris* de la glycine bêtaïne (57). Leur osmoadaptation est également moins coûteuse du point de vue énergétique (59). L'intégrité de l'enveloppe cellulaire de bactéries halophiles non coccoïdes est respectée en présence de NaCl ou de KCl. Sur des milieux dilués graduellement à partir du milieu de croissance, les cellules changent progressivement de formes et finissent par se lyser. Le phénomène de lyse en milieu hypotonique ne serait pas uniquement la conséquence d'un effet osmotique mais plutôt lié à la nécessité de fortes concentrations en sel pour maintenir l'intégrité de l'enveloppe cellulaire.

Alors que la plupart des halobactéries lysent lorsque la concentration en sel chute en dessous de 10 %, *Haloferax mediterranei* prolifère à cette concentration et peut même survivre à des concentrations inférieures à 5 %. Des études portant sur les réponses adaptatives d'*H. mediterranei* au stress provoqué par de faibles concentrations en NaCl (< 20 %) ont montrées que les cellules synthétisent un pigment rouge, la bactériorubérine. D'autres pigments rétinien comme l'halorhodopsine présents chez les espèces d'*Halobacterium* interviendrait dans l'osmorégulation en tant que pompe à Cl⁻.

b - Rôle de la paroi bactérienne

La paroi des espèces d'*Halobacterium* possède une couche externe visible en microscopie électronique (Stoeckenius et Rowen ; Steensland et Larsen d'après Staley J.T. *et al.* (72)) majoritairement constituée d'une glycoprotéine sulfatée de haut poids moléculaire analogue à celle des eubactéries et qui serait responsable de la stabilité. La surface bactérienne montre des motifs hexagonaux correspondant à l'agencement régulier des différentes sous-unités glycoprotéiques. Cet agencement n'est stable qu'en présence de sel.

c - La membrane lipidique

La membrane cytoplasmique des archéobactéries est formée d'éther-lipides difficilement dégradables, résistants à la chaleur, aux déformations et aux fortes concentrations en sel (72). Ces lipides sont plus ramifiés, avec des résidus chargés négativement (par exemple des résidus sulfate) que chez les Eubactéries. Ainsi, alors que les bactéries halotolérantes s'adaptent phénotypiquement aux fortes salinités en augmentant la proportion de lipides anioniques (principalement phosphatidylglycérol et/ou glycolipides), les archaebactéries seraient génotypiquement et phénotypiquement adaptées à l'environnement salin (69) et (70).

2 – Des protéines « adaptées »

En accumulant dans leur cytoplasme des quantités de sel proche de la saturation, les halobactéries empêchent effectivement la sortie d'eau mais se soumettent à un nouveau type de stress cellulaire : le stress salin. Dans de telles concentrations en KCl, des protéines « normales » deviennent insolubles et ne peuvent pas fonctionner. En effet, une protéine est naturellement constituée d'une chaîne d'acides aminés qui doit se replier de façon précise dans l'espace pour assurer la stabilité de l'ensemble. Ce repliement permet à la protéine d'assurer sa fonction dans la cellule. Or pour qu'une protéine puisse se replier convenablement, elle doit être hydratée à sa surface. Ainsi, si une protéine « normale » (non halophile) est plongée dans un solvant très salé, la couche d'hydratation nécessaire au repliement ne peut se former car les molécules d'eau sont toutes piégées par le sel du solvant. La protéine devient insoluble et précipite.

Les organismes halophiles ne semblent pas connaître ce stress cellulaire : leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles dans de fortes concentrations de KCl, mais elles se dénaturent dès que la concentration en sel diminue. En ce sens on pourrait dire que ces protéines sont elles-mêmes halophiles. Le problème scientifique se déplace donc du niveau cellulaire au niveau moléculaire. La nature halophile des protéines soulève un grand nombre de questions à la frontière de la physico-chimie et de la biologie.

Pour expliquer la solubilité des protéines halophiles, on a d'abord pensé que ces dernières possédaient une couche d'hydratation renforcée. Il y a quelques années, grâce à différentes méthodes biophysiques (centrifugation analytique, diffusion centrale de rayon X et de neutrons, densimétrie de haute précision) il a été démontré qu'au contraire, les protéines halophiles concentraient fortement le sel près de leur surface (21). Une protéine halophile associe environ 10 % de sa masse en KCl et 40 % en eau. Des mesures équivalentes sur des protéines non halophiles donnent 0 % de KCl et 20 % à 40 % d'eau. Ainsi, au lieu de se protéger du sel, comme les protéines conventionnelles, elles l'associent à leur structure et l'utilisent pour capturer les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, leur stabilisation et leur solubilité. Cette couche de sel et d'eau forme une sorte de cage qui empêche la protéine de se déplier. Mais comment cette dernière attire-t-elle le sel à sa surface ? En 1995 et 1996, les premières structures cristallographiques de protéines halophiles issues de la mer Morte (20) et (25), la malate deshydrogénase de *Haloarcula marismortui* et la ferredoxine du

même organisme, ont montré que ces deux dernières protéines se distinguent de leurs homologues non halophiles principalement par la nature chimique de leur acides aminés situés à leur surface. Elles sont en effet recouvertes d'acides aminés « acides » c'est à dire chargés négativement (23). Des études ultérieures, comme celle réalisées sur la glutamate déshydrogénase (7), ont montré que ce phénomène est généralisé à l'ensemble des protéines halophiles. Or ces groupements d'acides aminés acides sont connus pour interagir fortement avec les molécules d'eau et les ions positifs comme le K^+ . ces groupements hérissaient les contours des protéines et servaient d'attracteurs pour maintenir à leur surface une couche de sel hydratée. La génétique moléculaire a permis de vérifier ce modèle.

Pour évaluer le rôle d'un acide aminé de surface, une méthode consiste à le modifier. On fabrique alors une protéine mutante. Sur la malate déshydrogénase halophile, le remplacement d'un résidu acide de surface suffit à déstabiliser la structure repliée de l'enzyme (53). Tout se passe, en effet, comme si la perte d'un seul site interrompait le réseau d'hydratation et réduisait l'affinité globale de la protéine pour le sel. Ces observations montrent que l'adaptation des protéines aux conditions salines extrêmes ne se résument pas à une simple augmentation d'acides aminés acides en surface. La répartition des « points d'ancrage » de l'eau et du sel à la surface de la structure tridimensionnelle de la protéine joue également un rôle important. La biochimie des micro-organismes halophiles est si intimement dépendante du sel que l'on est tenté d'abandonner le terme « d'adaptation ». En effet, personne ne peut dire si les protéines halophiles sont le résultat d'une adaptation à un environnement extrême ou bien si elles représentent la survivance de conditions de vie primitives « salées ». Un travail récent suggère que les océans primitifs avaient une salinité élevée. Sur un plan purement thermodynamique, la présence d'une interface constituée de sel et d'eau à la surface d'une protéine est une situation avantageuse puisque c'est le solvant qui fournit une partie importante de l'énergie de stabilisation. Par ailleurs, il apparaîtrait que cette propriété étendrait considérablement la gamme de concentrations et de températures dans lesquelles les protéines halophiles restent stables, alors que les protéines non halophiles fonctionnent dans des conditions bien plus restreintes (4). On peut donc supposer que les organismes halophiles ont réussi à survivre mieux que les autres dans des milieux fluctuants en salinité comme en température, et qu'au contraire ce sont les organismes non halophiles qui ont dû s'adapter pour survivre dans des environnements de faible salinité.

3- Synthèse d'ATP

Les halobactéries sont responsables de la coloration rose observée dans les lacs salés, les marais salants, et dans les endroits où l'évaporation augmente la salinité de l'eau de mer, comme les lagons clos. Walter Stoeckenius a scindé la membrane cellulaire de *Halobacterium halobium* (croissance optimale pour 4.3 M de NaCl, l'eau de mer est à environ 0.6 M de NaCl) en 3 fractions jaune, rouge et pourpre. Cette dernière fraction est constituée d'une protéine de 26 kd associée à des lipides. Cette protéine membranaire pourpre a été appelée bactériorhodopsine.

C'est en 1975 que Richard Henderson et Nigel Unwin ont mis en évidence pour la première fois la structure de la membrane pourpre : des cristaux bi-dimensionnels enchâssés dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Plus récemment (en 1990) des cartes ont été réalisées par cryo-électro-microscopie. Les images de diffraction obtenues par cette méthode ont permis de déterminer la structure de la

protéine avec une résolutions horizontale de 3.5 angströms et une résolution verticale de 10 angströms. La protéine est constituée de 7 hélices alpha étroitement imbriquées disposées perpendiculairement au plan de la membrane (figure 41 page 93).

Lorsque l'oxygène est présent, les halobactéries synthétisent de l'ATP par phosphorylations oxydatives. Par contre quand l'oxygène vient à manquer, ces mêmes bactéries utilisent un système transducteur de l'énergie lumineuse pour la synthèse d'ATP. Les protons nécessaires à cette photosynthèse non chlorophyllienne sont transloqués : la bactériorhodopsine constitue une pompe à protons activée par l'énergie lumineuse. Les organismes possédant ce pigment particulier sont capables d'exploiter le gradient de proton pour la synthèse d'ATP. Pour chaque photon, deux protons sont transloquer depuis le cytosol vers le milieu extérieur.

Lorsque l'on expose la bactériorhodopsine à la lumière elle réalise un photocycle avec de nombreuses formes intermédiaires. Un schéma simplifié de ce photocycle est présenté figure 41 page 95 dans lequel ces formes intermédiaires sont représentées par des lettres. La large bande spectrale entre les formes B (forme initiale) et M, d'environ 160 nm, est à la base des propriétés photochromiques de la bactériorhodopsine..

Figure 40 - Bactériorhodopsine enchassée dans la bicouche lipidique

Figure 41 - Photocycle de la bactériorhodopsine

C – INTERETS INDUSTRIELS DES MICRO-ORGANISMES HALOPHILES

1 - Les exopolysaccharides (EPS) des bactéries marines

Les objectifs sont la valorisation, via la fermentation et l'extraction purification, de composés d'origine marine d'intérêt industriel.

Les sources hydrothermales d'origine océanique profonde sont un exemple d'environnement extrême où l'on trouve une biodiversité microbienne tout à fait remarquable. Mais faut-il pour cela considérer ces écosystèmes atypiques comme une source de nouveaux micro-organismes d'intérêt biotechnologique ? L'institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la mer (IFREMER) a organisé et participé depuis une dizaine d'années à plusieurs campagnes océanographiques afin d'étudier de tels sites et de se constituer une collection de micro-organismes adaptés à ces environnements extrêmes. Le second objectif reste la valorisation de ces micro-organismes atypiques en matière de biotechnologie. Parmi les études menées à ce jour, il convient de citer la recherche de micro-organismes capables de dégrader des molécules considérées à ce jour comme peu ou nullement biodégradables, celle de polymères biodégradables (poly-β hydroxyalcanoates ou PHA) ou d'enzymes et prioritairement d'enzymes thermostables, et enfin la synthèse d'hexopolysaccharides. Plusieurs de ces molécules isolées et caractérisées au laboratoire (enzymes et polysaccharides) ont été d'ores et déjà transférées auprès de partenaires industriels et sont, soit commercialisées, soit en cours de développement industriel.

Les polysaccharides peuvent être définis comme de longues molécules formées de répétition de motifs similaires en l'occurrence des glucides appelés couramment sucres. Ces polysaccharides représentent une famille de biopolymères dont la diversité de structure offre un large spectre de propriétés fonctionnelles. Outre l'intérêt connu depuis de nombreuses années de ces biopolymères dans l'exploitation pétrolière, dans l'agro-alimentaire comme agents de texture, dans l'agro-chimie, dans l'industrie du papier et dans bien d'autres domaines, les scientifiques et les industriels s'intéressent de plus en plus aux activités biologiques de ces molécules et à leur applications dans le domaine thérapeutique.

Initialement dominé par les gommes d'origine végétale et algale, le marché s'ouvre actuellement aux polysaccharides bactériens. Ces derniers présentent quelques atouts comme l'absence d'aléas climatiques, écologiques et politiques pouvant affecter la qualité, le coût et l'approvisionnement de leurs homologues extraits d'algues ou de plantes. De plus, les possibilités d'agir sur les conditions de fermentation (source de carbone, température, aération, pH, etc...) en vue d'optimiser la production mais aussi de modifier le polymère produit, jouent en faveur de la fermentation bactérienne. Ces polymères présentent enfin un degré de régularité de structure plus important et peuvent être extraits et purifiés sans l'utilisation de conditions drastiques. Les inconvénients de ces polymères marins rest

ces polysaccharides. En ce sens les conditions atypiques des sources marines hydrothermales profondes les présentent alors comme un champ d'investigation privilégié pour cette recherche de nouvelles espèces et de biomolécules aux propriétés originales.

Le criblage des souches productrices de polysaccharides est réalisé à partir de la collection générée à l'issue des différentes campagnes océanographiques et comprenant, à ce jour, plus de 1000 isolats. La seconde phase consiste en la fermentation, c'est à dire la production de ces polysaccharides en conditions contrôlées, leur purification et caractérisation (32) et (50). De la détermination de leurs caractéristiques chimiques et rhéologiques, peuvent en découler les applications potentielles au regard de la spécificité et/ou du caractère innovant de ces molécules. Ce criblage a permis à ce jour la caractérisation de près de 30 souches productrices, en conditions de laboratoire, de ces exopolymères. Ces souches appartiennent aux genres *Alteromonas* (*A. infernus* (64), *A. macleodii* (65) et (67)), *Pseudoalteromonas* et *Vibrio* (*V. diabolicus* (66)) et ont toutes pour origine des sites hydrothermaux situés le long des différentes failles à des profondeurs comprises entre 2000 et 3550 m. Malgré les conditions physico-chimiques de leur habitat naturel, l'ensemble des souches identifiés ont comme caractéristiques physiologiques d'être toutes mésophiles, hétérotrophes et aérobies, soient des conditions de croissance en adéquation avec les réalités industrielles de fermentation. Si ces bactéries ont une origine « extrêmophile », elles ne présentent cependant pas de caractéristiques d'« extrêmophiles » au regard de leurs conditions de croissance.

Parfois l'obtention de polymères nécessite une technologie poussée car leur biosynthèse requiert bien souvent des conditions extrêmes. C'est ainsi que la production d'acide poly gamma-glutamique ou d'acide poly-béta-hydroxy-butyrique par des archaebactéries halophiles extrêmes à nécessité la création d'un bioréacteur résistant à la corrosion (39).

2 – La bactériorhodopsine

L'excellente stabilité thermodynamique et photochimique de la bactériorhodopsine ouvre un vaste champ d'applications techniques basé sur ses propriétés protomotrices, photoélectriques et photochromiques : holographie, modulateurs spatio-lumineux, rétine artificielle, informatique, mémoire optique volumétrique et associative.

A partir du type sauvage de bactériorhodopsine isolé de *Halobacterium salinarium* souche S9 un mutant a été obtenu par génie génétique (*H. salinarium* sp. L33.). Le « simple » remplacement du résidu acide aspartique en position 96 par un résidu asparagine permet de maintenir la protéine sous sa forme « M » entre 10 msec et plus de 100 sec en faisant varier le pH extracellulaire.

La bactériorhodopsine est commercialisée sous forme lyophilisée (membranes pourpres lyophilisées) ou sous forme de films optiques.

CONCLUSION

On pourrait conclure en disant que le sel à la fois inhibe, sélectionne et abrite les micro-organismes. En effet, si l'abaissement de l'activité de l'eau qu'il engendre empêche le développement de la plupart des microbes, il en sélectionne d'autres voire en héberge. Les halophobes ont besoins de beaucoup d'eau disponible, d'une A_w supérieure à 0.95. C'est le cas de la plupart des germes dangereux (Salmonelles, Clostridies, Staphylocoques pour leur toxinogénèse...) et les denrées correspondantes considérées comme très périssables devront être conservées à une température inférieure à. Pour des A_w comprise entre 0.95 et 0.91 certaines bactéries halotolérantes responsables d'altérations se développent et les denrées possédant cette caractéristique sont encore considérées comme périssables : elles devront être gardées au frais, à une température inférieure à 10 °C. Enfin, en-dessous de 0.91 aucun germe dangereux ne se développe : c'est le domaine des moisissures. Ces aliments sont considérés comme stables et peuvent être conservées à n'importe quelle température dans un air sec.

Ainsi, sur le plan de la sécurité alimentaire, le sel assure généralement seul un assainissement incomplet de la plupart des denrées. Aux teneurs en sel usuellement utilisées, la conservation nécessite l'ajustement d'autres paramètres physico-chimiques que l' A_w tels que la température et le pH (potentiel d'hydrogène). Comme pour l'activité de l'eau, selon leur pH et leur composition les aliments sont qualifiés de très périssables, périssables ou stables. Cela illustre l'importance qu'il faut attacher à réfrigérer le plus vite possible après leur préparation culinaires certaines catégories d'aliments qui, en quelques heures, peuvent devenir toxique : ce sont les aliments à risque. La recherche d'aliments « blanc » constitue un point critique qu'il faut maîtriser, notamment en évitant les contaminations tout au long de la chaîne de fabrication et même au-delà.

Par ailleurs si le sel tend à être substitué par d'autres agents conservateur moins « nuisibles » à la santé, il n'en reste pas moins que cette denrée demeure le premier assaisonnement, le premier des conservateur mais aussi une nécessité pour l'organisme.

Enfin, il peut paraître étonnant que ce produit si commun et si « antique » pour l'homme puisse encore de nos jours susciter tant d'engouement et receler tant de mystères.

ANNEXE 1 . MODELISATIONS MATHÉMATIQUES DES ISOTHERMES DE SORPTION

Il y a eu de très nombreux modèles mathématiques construits pour décrire les isothermes de sorption des aliments. Ils ont été établis sur la base de différentes théories du phénomène adsorption-désorption. L'isotherme de sorption, relation sigmoïde entre l' A_w et la teneur en eau du produit, est admise depuis plus d'un demi-siècle. Il faut néanmoins rappeler que la courbe de sorption et l'équivalence $A_w - HR$ n'ont de sens que si il y a équilibre thermodynamique c'est à dire si le bilan des échanges d'eau et de chaleur entre le produit et l'air environnant est constamment nul.

Les équations établissant les isothermes de sorption dans les aliments sont intéressantes parcequ'elles permettent en principe de prévoir les conditions d'équilibre à réaliser au cours d'un traitement technologique ou pour s'assurer d'une durée définie de conservation sans altération.. Aucun modèle, toutefois, ne semble avoir abouti à des résultats précis pour l'ensemble de la gamme des A_w et pour tous les types d'aliments. Ceci est dû au fait que les isothermes de sorption des produits alimentaires intègrent de très nombreuses propriétés hygroscopiques des différents constituants de l'aliment et que l'abaissement de l' A_w est dû à une combinaison de facteurs, dont chacun peut être prédominant dans telle ou telle zone de la courbe pour un aliment donné.

La plupart des théories se rapprochent du modèle classique de Langmuir qui, toutefois, n'est valable lors de l'adsorption de l'eau sur une surface plane, que jusqu'à ce que celle-ci soit recouverte d'une couche monomoléculaire. Parmi les modèles mathématiques proposés, l'un des plus classiques est celui de Brunauer, Emmett et Teller sur l'adsorption des gaz dit isotherme BET. Elle répond à l'équation suivante :

$$A_w / H(1-A_w) = 1 / (H_1 C) + (A_w (C - 1)) / (H_1 C) \quad (19)$$

Dans laquelle

H = teneur en eau du produit alimentaire exprimé en g % MS

H_1 = teneur en eau correspondant à la couche monomoléculaire (c'est à dire correspondant à la saturation de chaque site primaire d'adsorption par une molécule d'eau) exprimée aussi en g % g de matière sèche délipidée.

$C = K.e^{(Q_s/RT)}$, constante où Q_s est la chaleur d'adsorption considérée comme constante.(71)

ANNEXE 2 – IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES DES DENREES ALIMENTAIRES

A Identification des bactéries

1 - Identification des pathogènes

a - *Salmonella*

- *Caractères généraux*

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, dont il possède les principaux caractères : bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, catalase positifs, nitrate positifs, oxydases négatifs, fermentant le glucose. Les salmonelles sont généralement mobiles avec ciliature péritriche, ne fermentent pas le lactose, ne possèdent pas d'uréase, sont citrate positives, lysine décarboxylase positives, indoles négatives, H₂S positives, réaction au rouge de méthyl et de Voges-Proskauer négatives.

Les salmonelles sont présentes chez toutes les espèces animales domestiques ou sauvages, qui constituent avec l'environnement leur véritable réservoir. Les principaux aliments servant de vecteurs chez l'homme sont les viandes de boucherie, les volailles, les œufs et les produits dérivés. Les principaux sérovars actuellement responsables de toxi-infections alimentaires (TIA) sont Typhimurium et Enteritidis. Il reste cependant nécessaire de considérer que la majorité des sérovars isolés des aliments peut extérioriser un pouvoir pathogène dès lors que les salmonelles sont présentes en nombre suffisant (de l'ordre de 10⁶ cellules). Dans la plupart des cas, les TIA font donc suite à des erreurs permettant une croissance bactérienne.

- *Méthode d'analyse*

■ Préenrichissement

Après dilution de 25 g d'aliments dans 9 volumes d'eau peptonée tamponnée (EPT) et broyage-homogénéisation, la phase de préenrichissement est réalisée par incubation de l'homogénéisât 16-20 heures à 37 °C.

■ Enrichissement

La phase d'enrichissement se fait à l'aide de deux milieux sélectifs liquides ensemencés parallèlement : le bouillon au sélénite-cystine et le bouillon Rappaport et Vassiliadis (RV). Le sélénite inhibe la croissance des coliformes et des entérocoques mais *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* et *Pseudomonas* ne sont pas inhibés. Le bouillon au sélénite est incubé 24 heures à 37 °C. Le bouillon RV contient une forte concentration en chlorure de magnésium et du vert malachite qui ralentissent la croissance des germes autres que les salmonelles. *Salmonella typhimurium* et *Shigella* sont également inhibés par le vert malachite. L'abaissement du pH à 5.5 améliore la sélectivité. Ce bouillon est incubé 24 heures à 42 °C.

■ Isolement sur milieux sélectifs solides

A partir des bouillons d'enrichissement, on ensemence en parallèle deux milieux solides : la gélose au rouge de phénol et au vert brillant (GVB) et une autre gélose sélective au choix, généralement la gélose Hektoen.

Le vert brillant inhibe la flore Gram positif et la plupart de la flore Gram négatif. La gélose GVB contient du lactose et du saccharose dont la fermentation se traduit par un abaissement du pH et une coloration jaune-verte du rouge de phénol. Les boîtes de Pétri sont incubées 24 heures à 37 °C. Les colonies caractéristiques des salmonelles sont rouges (lactose et saccharose négatifs). D'autres germes (*Proteus*, *Pseudomonas*,...) peuvent néanmoins donner naissance à de telles colonies.

La gélose Hektoen contient des sels biliaries qui inhibent la flore à Gram positif et quelques germes à Gram négatif. Ce milieu contient trois sucres : du lactose, du saccharose et de la salicine ainsi que du thiosulfate et du citrate ferrique. Les colonies produisant du sulfure d'hydrogène sont donc colorées en noir. Les indicateurs colorés : bleu de bromothymol et fuschine acide permettant de colorer en jaune-orangé les entérobactéries lactose positives et en bleu-vert les lactoses négatives. Les boîtes sont incubées 24 heures à 37 °C. On obtient des colonies pouvant présenter trois aspects : jaune-saumon (coliformes) ; vertes ou bleuâtres avec ou sans centre noir (*Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*) ; bleu-vert à bords irréguliers (*Pseudomonas*).

■ Identification

Il est indispensable de réaliser une identification sur plusieurs colonies typiques ou suspectes (au moins deux). Pour cela, différents tests sont réalisés. On ensemence en stries et en piqûre en culot une gélose de Kligler en pente. Cette gélose contient du lactose, du glucose, du rouge de phénol (indicateur de pH virant au jaune lors d'acidification), du thiosulfate et du citrate ferrique. Au bout de 24 heures d'incubation à 37 °C, elle fournit quatre renseignements principaux : fermentation du glucose lorsque le culot est jaune ; fermentation du lactose lorsque la pente est jaune ; production de gaz lors d'apparition de bulles dans le culot ; formation d'H₂S lors de l'apparition d'une coloration noire entre le culot et la pente. Les salmonelles donnent donc une pente rouge, un culot jaune avec éventuellement formation de bulles et d'une coloration noire. On teste ensuite les caractères suivants : uréase négative ; production d'indole négative ; décarboxylation de la lysine positive ; β-galactosidase négative ; réaction de Voges-Proskauer négative.

Remarque : en routine, on peut également utiliser des galeries miniaturisées type API, ainsi que d'autres tests biochimiques : citrate positif, tryptophane désaminase négative. L'étape ultime consiste en une détermination du sérotype.

b – *Staphylococcus aureus* (coagulase positifs, entérotoxigènes)

- Caractères généraux

Ce sont des *Cocci* à Gram positif, catalase positifs, anaérobies facultatifs. Ils sont mésophiles, thermosensibles et xérotolérants.

Les staphylocoques sont des saprophytes de l'homme et de l'animal retrouvés sur la peau et les muqueuses. Certaines espèces sont capables de produire des entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires. Ces espèces (*S. aureus* et *S. enteritidis*) produisent habituellement une coagulase libre et une thermonucléase. Bien

que les entérotoxines soient thermostables, les aliments impliqués dans les intoxications sont généralement contaminés après cuisson.

- *Méthode d'analyse*

La détection de *S. aureus* se réalise en deux étapes : isolement sur milieu sélectif puis identification de l'espèce.

La recherche commence donc par ensemencement sur gélose Baird-Parker qui est composée de peptone de caséine ou de tryptone, d'extrait de levure, d'extrait de viande, de glycine, de pyruvate de sodium et de chlorure de lithium auxquels on ajoute une émulsion de jaune d'œuf-tellurite et éventuellement du sulfaméthazine. Le chlorure de lithium, le tellurite et la forte concentration en glycine inhibent la flore secondaire. Par contre, le pyruvate et la glycine agissent comme sélecteurs de croissance pour les staphylocoques. L'addition de sulfaméthazine permet de supprimer la croissance de *Proteus*.

L'ensemencement est réalisé en surface (0.1 ml) et les boîtes sont incubées 24-48 heures à 37°C.

Les colonies caractéristiques de staphylocoques sont petites, noires, brillantes, convexes et entourées d'un double halo. La coloration noire des colonies est due à la réduction du tellurite en tellure. Le halo le plus large (2 à 5 mm) d'éclaircissement est dû à l'action d'une lipase et d'une lécithinase qui dégradent la lécithine du jaune d'œuf. Le halo blanc opaque en bordure des colonies est dû au dépôt des acides gras de la lécithine non utilisés par le micro-organisme.

D'autres espèces de staphylocoques coagulase négative (ainsi que des *Bacillus* et *Proteus*) peuvent donner des colonies caractéristiques, une confirmation de l'espèce est donc nécessaire. Cette confirmation est réalisée sur au moins 5 colonies. Les colonies à confirmer sont repiquées dans un bouillon riche non sélectif (bouillon cœur-cerveau) mis à incuber 24 heures à 37 °C. La présence de coagulase libre caractéristique de *S. aureus* est mise en évidence par coagulation de plasma de lapin : 0.1 ml de la culture en bouillon sont ajoutés à 0.3 ml de plasma et mis à incuber à 37 °C. On examine les tubes après 4 à 6 heures et la réaction est considérée comme positive si le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initial.

c - *Listeria monocytogenes*

- *Caractères généraux*

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif, non sporulant, anaérobie facultatif, catalase positif, oxydase négatif, psychotrophe, thermotolérant, acidotolérant et xérotolérant.

C'est un germe très ubiquiste rencontré dans de nombreux environnements et chez des porteurs sains animaux ou humains. Il est responsable d'infections alimentaires surtout chez les sujets à risque et provoque essentiellement des avortements et des méningo-encéphalites.

- *Méthode d'analyse (norme AFNOR V 08-055)*

Sa recherche s'effectue en quatre étapes successives :

- **Enrichissement primaire**

Un enrichissement primaire se fait à l'aide du bouillon Fraser demi qui contient des éléments nutritifs pour *Listeria* (peptone, extrait de levure, extrait de viande), du chlorure de sodium, de l'esculine, du citrate ferrique, du chlorure de lithium, de l'acide nalidixique et de l'acriflavine. L'esculine est hydrolysée par *Listeria* en glucose et en esculetine qui forme un complexe noir avec les ions ferriques. Le fer favorise également la croissance des *Listeria*. Le chlorure de lithium inhibe la plupart des entérocoques capables d'hydrolyser l'esculine. L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des germes sensibles. L'acriflavine supprime la croissance de la flore à Gram positif secondaire. La forte teneur en NaCl permet d'accroître la sélectivité du milieu. L'incubation est de 18-24 heures à 30 °C.

- **Isolement sur milieu sélectif solide**

On réalise ensuite un isolement si milieu gélosé sélectif au choix, soit gélose Oxford, soit gélose Palcam. La plus communément utilisée est la gélose Palcam qui contient des éléments nutritifs (polypeptone, extrait de levure, glucose et amidon), du chlorure de sodium, de l'esculine, du citrate ferrique, du chlorure de lithium, du mannitol et du rouge de phénol, auxquels on ajoute extemporanément de la polymyxine, de la ceftazimide et de l'acriflavine. La fermentation du mannitol par des germes contaminants est mise en évidence par un virage au jaune du rouge de phénol. L'association chlorure de lithium, ceftazimide, polymyxine et acriflavine inhibe la flore secondaire. Les boîtes sont incubées 24-48 heures à 37 °C. Les colonies caractéristiques de *Listeria* sont verdâtres entourées d'un halo noir, elles sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale.

- **Enrichissement secondaire en milieu liquide**

Parallèlement à ce premier isolement, on réalise un enrichissement secondaire par transfert de 0.1 ml de l'enrichissement primaire dans 10 ml de bouillon Fraser. Sa composition est identique au bouillon Fraser-demi mais les proportions d'acriflavine et d'acide nalidixique sont doubles. Ces tubes sont incubés 24-48 heures à 37 °C.

- **Isolement**

A partir de cet enrichissement secondaire, on réalise deux isollements à 24 et 48 heures soit en gélose Oxford, soit en gélose Palcam incubées 48 heures à 37 °C.

- **Identification**

Il faut ensuite effectuer une identification du genre et de l'espèce. Après repiquage d'au moins 5 colonies typiques sur gélose nutritive, on réalise plusieurs tests biochimiques. Pour confirmer le genre, on met en œuvre une réaction de la catalase qui doit être positive que l'on peut compléter par un examen de la mobilité (mobilité en pirouette à 25-30 °C sur état frais ou « pousse en ombrelle » sur gélose mobilité inoculée par piqûre centrale et incubée 48 heures à 25 °C). L'espèce *monocytogenes* se distingue par un test de CAMP, la présence d'une hémolysine, la fermentation du rhamnose et non celle du xylose.

Le test CAMP correspond à l'observation de la zone de β -hémolyse à l'intersection de stries de culture d'une souche d'essai avec une souche de *Rhodococcus equi* et de *Staphylococcus aureus* ensemencées sur gélose au sang. *L. monocytogenes* donne une réaction positive avec *S. aureus* sous forme d'une petite zone arrondie d'hémolyse accentuée légèrement dans la zone légèrement hémolytique de *S. aureus*. Par contre, avec *R. equi*, *L. monocytogenes* donne une réaction négative, c'est à dire qu'il n'y a pas formation d'une large zone d'hémolyse à l'intersection avec la strie de *R. equi*.

La présence de β -hémolysine est déterminée par piqûre dans la gélose au sang.

d – *Vibrio parahaemolyticus*

- Caractères généraux

Vibrio parahaemolyticus est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif, mobile, catalase positif, oxydase positif, xérotolérant.

Il vit dans les milieux marins et contamine les animaux marins en été dès que la température de l'eau dépasse 15 °C. La toxi-infection alimentaire qu'il entraîne apparaît en 12-24 heures et se traduit par diarrhée, nausées, vomissements, céphalées. Les principaux aliments incriminés sont les crustacés, les fruits de mer et les poissons crus.

- Méthode d'analyse (norme AFNOR V 08-024)

La recherche de *Vibrio parahaemolyticus* est généralement réalisée en trois phases successives :

■ Enrichissement en milieux sélectifs liquides :

Deux suspensions mères sont préparées à partir de deux prises d'essai (25g) par dilution en parallèle dans deux milieux sélectifs d'enrichissement : le bouillon glucosé salé à la polymixine B (SPB) et l'eau peptonée salée alcaline ou le bouillon glucosé salé au dodécyl sulfate de sodium (GST). L'incubation de ces différents bouillons est de 7-8 heures à 35 ou 37 °C.

■ Isolement et identification en milieux sélectifs solides

A partir des bouillons d'enrichissement, on ensemence en parallèle deux milieux sélectifs : la gélose au thiosulfate, au citrate, à la bile et au saccharose (TCBS) et la gélose à la tryptone, à la peptone de soja et au chlorure de triphényltétrazolium (TSAT). Les boîtes sont incubées à 35 ou 37 °C, 18 heures pour le TCBS et 20-24 heures pour le TSAT. Sur milieu TCBS, les colonies caractéristiques de *V. parahaemolyticus* sont lisses et vertes (saccharose négatif). Sur milieu TSAT, elles sont lisses et rouges foncé (réduction du chlorure de triphényltétrazolium).

■ Confirmation

Une confirmation est nécessaire sur au moins 5 colonies. On réalise pour cela plusieurs tests biochimiques : essai à l'oxydase positif ; mobilité ; glucose positif, lactose et saccharose négatif, gaz négatif, H₂S négatif (gélose TSI, salé) ; croissance aéro-anaérobie ; décarboxylation de la lysine ; formation d'indole ; absence de β -galactosidase.

e - *Clostridium*

- *Caractères généraux*

Il existe de nombreuses espèces. Ce sont des germes thermophiles à psychrotrophes, anaérobies stricts, tolérant 2.5 à 6.5 % de sel, fortement protéolytiques. On les trouve dans les eaux, les sols, la boue et dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Ils sont responsables :

- de tétanos, de gangrène, d'entérotoxémie,...
- d'intoxication alimentaire : *Cl. Botulinum*
- de toxi-infection alimentaire : *Cl. Perfringens*
- d'altérations :
 - des aliments protéiques : putréfaction
 - des conserves : bombement, noircissement par dégagement de SH₂ : *Cl. nigrificans*
 - des matières grasses : *Cl. butyricum*

- *Méthode d'analyse : exemple de Clostridium perfringens (normes AFNOR NF V 08-019 et V 08-056)*

■ Mise en culture sur milieu spécifique :

La gélose tryptose-sulfite à la cyclosérine (TSC). Cette gélose contient du tryptose, de la peptone de soja, de l'extrait de levure, du disulfite de sodium, du citrate de fer ammoniacal auxquels on ajoute de la cyclosérine. Le citrate de fer ammoniacal et le sulfite de sodium permettent de mettre en évidence les colonies productrices d'H₂S. La cyclosérine est sélective vis à vis de *Cl. perfringens*.

Le milieu est ensemencé en bicouche et les boîtes sont incubées en anaérobiose 20 heures à 37 °C. Les colonies caractéristiques sont entourées d'un halo noir.

■ Confirmation biochimique :

Sur au moins trois de ces colonies qui sont donc incubées dans des bouillons thioglycolate incubés 20 heures à 37 °C en anaérobiose. Après incubation, on ensemence des bouillons lactose-sulfite en tube avec cloche de Durham, que l'on incube 24 heures à 46 °C. Les bactéries qui se développent en produisant du gaz et en formant un précipité noir sont considérées comme étant des *Cl. perfringens*.

2 - Identification des bactéries responsables d'altération

a - *Lactobacillus*

- *Caractères généraux*

Ce sont des bacilles à Gram positif, non sporulants, aérobies ou anaérobies facultatifs, catalase négatifs, acidophiles, thermophiles à psychrotrophes. Ils fermentent les sucres en acide lactique et autres produits à un pH optimum acide (4 à 4.5). Ils ont une origine animale et végétale : tube digestif, laits fermentés.

En tant que germes d'altération, ils entraînent une coloration verte des viandes salées cuites, un sùrissement (acide lactique) des viandes conditionnées sous vide et pour les souches hétérofermentaires, un gonflement des sachets et des barquettes.

En tant qu'agent de la maturation, ils participent à la fabrication de produits fermentés divers : carnés, laitiers et végétaux.

- *Méthode d'analyse*

Leur recherche se fait à partir de milieux sélectifs dérivés du MRS (De Man, Rogosa et Sharpe). Le MRS est composé d'extrait de viande, d'extrait de levure, de glucose et de facteurs de croissance des bactéries lactiques (polysorbate, acétate, magnésium et manganèse). Le milieu le plus utilisé dans les industries de la viande est le milieu de Rogosa ou LBS rendu plus sélectif que le MRS par ajustement du pH à 5.4 et ajout d'acétate de sodium et de citrate d'ammonium qui inhibent la flore secondaire. La croissance des lactobacilles est de plus favorisée par la présence de Tween 80 (acides gras). Ce milieu n'est cependant pas adapté à l'isolement de certains lactobacilles d'origine laitière.

L'incubation est réalisée en anaérobiose à 30 °C pendant 5 jours. Les colonies sont rugueuses ou lisses, petites, opaques et plus ou moins blanches.

b - *Leuconostoc*

- *Caractères généraux*

Ce sont des *Cocci* Gram positif, catalase négatifs, hétérofermentaires, acidophiles. Ils peuvent provoquer la formation de limon dans les produits cuits à base de viande.

- *Méthode d'analyse*

Leur recherche se fait à partir d'un milieu électif : la gélose hypersaccharosée. Celle-ci met à profit la propriété des leuconostoc dextranigènes (*L. mesenteroides*) de produire, à partir de saccharose, une capsule polysaccharidique épaisse.

Les colonies caractéristiques sont grosses, très muqueuses, filantes en 24 à 48 heures d'incubation à une température maximale de 30 °C.

NB : *Pediococcus* est un genre voisin

c - *Pseudomonas*

- *Caractères généraux*

Ce sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies stricts, catalase positifs, oxydase négatifs, psychrotrophes. Ils peuvent être classés selon leur caractère pigmenté ou non. Ils sont responsables de l'altération superficielle de aliments réfrigérés : viandes, volailles, poissons, lait et œufs. Ils possèdent des enzymes lipolytiques et protéolytiques qui entraînent rancissement et putréfaction. Ceci se traduit par la formation d'odeurs désagréables et de couleurs anormales lors du développement de souches pigmentées.

- *Méthode d'analyse (norme AFNOR NF V 04-504)*

Leur recherche se fait à l'aide d'un milieu sélectif : la gélose CFC (Céphalosporine – Fucidine – Cétrimide). Cette gélose contient comme substrats nutritifs de la peptone de gélatine et de la tryptone. La présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium stimule la production de pyocyanine. Trois antibiotiques permettent d'inhiber les flores secondaires. La céphalosporine permet d'éliminer plus particulièrement les entérobactéries, les staphylocoques et les streptocoques. La fucidine inhibe le développement du groupe des *Acinetobacter-Psychrobacter*. Le cétrimide inhibe la croissance des levures et des moisissures.

L'ensemencement est effectué en masse et les boîtes de Pétri sont mises à incuber 48 – 72 heures à 22 °C.

L'identification des *pseudomonas* doit se poursuivre par une confirmation biochimique : test à l'oxydase et utilisation des sucres en milieu de Kligler uniquement en aérobiose.

B Identification des levures et moisissures

- *Caractères généraux*

Les levures sont responsables de l'altération des produits sucrés et salés. Leur développement peut s'accompagner de formation de couleurs anormales (colonies souvent pigmentées), de troubles dans les boissons, d'odeurs et de goûts anormaux, ou de gonflements de produits ou de leur emballage.

Les moisissures sont à l'origine d'altérations superficielles. Ces altérations peuvent être visuelles (couleurs anormales), de texture (« poils de chat), gustatives (rancidité, goût de « moisi ») ou olfactives.

- *Méthodes d'analyses (norme AFNOR NF V 08-022)*

Leur recherche fait appel à un milieu spécifique : la gélose glucosée au chloramphénicol ou à l'oxytétracycline (YGC, Yeast extract Glucose Chloramphénicol ou OGY, Oxytétracycline Glucose Yeast extract). Ces milieux contiennent du glucose et de l'extrait de levure qui sont des facteurs nutritifs nécessaire au développement des levures et des moisissures. La présence de chloramphénicol (ou d'oxytétracycline) entraîne une inhibition de la quasi-totalité des espèces bactériennes. Le pH acide (6.6) est également un facteur de sélectivité.

L'ensemencement est fait en masse et les boîtes de pétri sont incubées à 25 °C. Leur lecture est réalisée après 3.4 à 5 jours d'incubation (10).

De nombreux milieux pour l'isolement et la culture des champignons xérophiles sont répertoriés dans la littérature mais aucun n'est vraiment adapté à l'ensemble des xérophiles. Par exemple *Monascus*, *Eremascus* ou *Chrysosporium* ne croissent pas sur malt agar (Christensen –d'après Pitt (63)-) ; *Monascus* et *Eremascus albus* ont une faible croissance sur CIMA (Pitt et Christian –d'après Pitt (63)-) ; de même, le milieu de Harrold M40Y(d'après Pitt (63)) pourtant largement utilisé, a une trop forte *Aw* pour *Monascus* et *Chrysosporium*. Les milieux contenant de trop fortes

teneurs en sucrose (Dallyn et Everton –d’après Pitt (63)-) ne sont pas satisfaisants car l’Aw finale après inversion du sucrose varie avec le pH des autres ingrédients.

Les champignons xérophiles les plus fragiles comme certaines espèces de *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus* et *Emericella*, se développent bien sur Czapek agar (CA), alors que la plupart des espèces d’*Eurotium* s’accommodent mieux sur Czapek agar additionné de 20 % de sucrose (C20S). Cependant, ces milieux sont stériles pour *Monascus*, *Eremascus* et *Chrysosporium* qui demandent un milieu relativement riche mais dont l’Aw est faible. Selon Pitt et Hocking (d’après Pitt (63)), Yeast Nitrogen Base (Difco) avec 40 % de glucose additionné (YNB40G) a permis leur culture.

Il faut souligner que le milieu d’isolation de la flore xérophile doit permettre à tous les xérophiles de se développer. C’est dans ce but que le milieu MY40G est fortement recommandé par rapport aux autres plus sélectifs (malt agar, Czapek agar, potato dextrose agar).

Pour déterminer si un champignon isolé est xérophile, il suffit de le placer sur un milieu dont l’Aw est de 0.85 et de l’incuber. C’est le cas du milieu MY60G (Aw d’environ 0.845). Le séchage de plateauxensemencés de MY60G est déconseillé, il vaudrait mieux les incuber en espace confiné et en présence de solution saturée de KCl (Aw de 0.843 ; Robinson et Stokes –d’après Pitt (63)-).

En ce qui concerne les levures, l’isolement et la culture sur malt extract agar (MEA) additionné de 2 % de glucose ou, si nécessaire, 20, 40 ou 50 % de glucose (ww) sont toujours satisfaisants.

Formules des différents milieux :

- Czapek agar (CA) :
 - 1.0 g de K₂HPO₄
 - 2.0 g de NaNO₃
 - 0.5 g de MgSO₄·7H₂O
 - 0.5 g de KCl
 - 0.01 g de FeSO₄·7H₂O
 - 30 g de sucrose
 - 15 g d’agar
 - 1 litre d’eau distillée
 - stérilisation par autoclave

- Czapek agar additionné de 20 % de sucrose (C20S) :

Pour obtenir ce milieu il faut substituer les 30 g de sucrose du CA par 200 g de sucrose et stériliser en autoclave.

- Malt Extract Agar (MEA) :
 - 20 g d’extrait de malt en poudre
 - 20 g d’agar
 - eau distillée jusqu’au litre
 - stérilisation par autoclave

- Malt Extract Yeast Extract, 40 % Glucose Agar (MY40G) :
 - 12 g d'extrait de malt
 - 3g d'extrait de levure
 - 400 g de glucose
 - 12 g d'agar 600 g d'eau
 - stérilisation à la vapeur pendant 30 minutes
 - ph final d'environ 5.5 ; aw d'environ 0.92

- Malt Extract Yeast Extract 60 % Glucose Agar :
 - 8 g extrait de malt
 - 2 g d'extrait de levure
 - 600 g de Glucose
 - Stérilisation à la vapeur pendant 30 minutes

- Yeast Nitrogen Base 40 % Glucose Agar (YNB40G) :
 - 4.0 g de Yeast nitrogen base (Difco)
 - 3.5 g d'acide succinique
 - 5.0 ml de NaOH (10 %)
 - 400 g de glucose
 - 12 g d'agar
 - 600 g d'eau
 - stérilisation à la vapeur 30 minutes
 - $4.2 < \text{ph} < 4.5$; et aw d'environ 0.91
 -

Conditions d'isolement des moisissures

L'analyse microbiologique de tout produit doit mettre en jeu des conditions d'isolement judicieusement choisies pour permettre l'expression la plus complète possible des micro-organismes recherchés. Il convient notamment de retenir au laboratoire les facteurs et paramètres de l'environnement naturel qui ont pu favoriser l'implantation d'une flore particulière sur le substrat étudié : par exemple un milieu de culture à forte pression osmotique pour la recherche des champignons xérophiles, halophiles ou osmophiles se développant, selon les cas, sur un substrat pauvre en eau (fruits secs, céréales), riche en sel (salaisons, saumures), ou en sucre (miel, confiture) (6).

Milieux pour champignons halophiles

On ajoute au milieu de culture du chlorure de sodium à une concentration supérieure à 11 %

Quelques éléments permettant l'identification de champignons et de moisissures sont regroupés dans les tableaux XX à XXII.

Tableau XX - Principaux renseignements permettant l'identification des champignons connus se développant autour d'une Aw de 0.85 (63).

A.	Production d'ascospores en moins d'une semaine sur MEA contenant 40 % (w/w) glucose	<i>Saccharomyces rouxii</i>
AA.	Pas de sporulation sur le milieu précédant	B.
B.	Production d'ascospores en moins d'une semaine sur MEA. Les asques contiennent 2-4 ascospores à parois lisses	<i>Saccharomyces bailii</i>
BB.	Pas de production d'ascospores sur MEA ; sur milieu adéquat les asques contiennent une, rarement 2 ascospores à paroi rugueuses	<i>Saccharomyces hansenii</i>

Tableau XXI - Identification des moisissures par culture comparée sur milieux CA, C20S et MY40G après une ou plusieurs semaines d'incubation à 22-28°C (63).

A.	Croissance sur CA, C20S et MY40G en moins d'une semaine	B.
AA.	Pas de croissance au moins sur CA	G
B.	Colonies brunes, inférieures à 10 mm de diamètre en une semaines sur tous les milieux	<i>Wallemia</i>
BB.	Colonies différentes	C
C.	Présence de cleistothécia (0.1-0.2 mm de diamètre.), au moins sur milieu C20S	<i>Eurotium</i>
CC.	Pas de cleistothécia jaunes	D
D.	Présence de cleistothécia sur au moins milieu CA, enveloppés de masses de cellules stériles incolores ou grisâtres	<i>Emericella</i>
DD.	Pas de cleistothécia	E
E.	Colonies surmontées de spores asésuéesportées par des « tiges »	<i>Aspergillus</i>
EE.	Si aspect différent	F
F.	Colonies marron	<i>Paecilomyces</i>
FF.	Colonies gris-bleu ou gris-vert	<i>Penicillium</i>
G.	Présence de cleistothécia jaunes (0.1-0.2 mm de diamètre)	<i>Eurotium</i>
GG.	Absence de cleistothécia	H
H.	Présence de cleistothécia blancs (0.1-0.3 mm diam.) sur milieu MY40G	<i>Monascus</i>
HH.	Absence de cleistothécia	I
I.	Présence d'asques sur milieu MY40G	<i>Eremascus</i>
II.	Présence uniquement d'aleuriospores	<i>Chrysosporium</i>

Tableau XXII - Eléments morphologiques d'identification des moisissures D'après les aspects microscopiques sur milieu MY40G (63).

A.	Cultures marron inférieures à 10 mm de diamètre avec des spores portées en chaînes (cubiques dans un premier temps puis sphéroïdes)	<i>Wallemia</i>
AA.	Si aspect différent	<i>B</i>
B.	Présence de cleistothécia présentant des ascospores en 2 à 4 semaines	<i>C</i>
BB.	Absence de cleistothécia	<i>E</i>
C.	Cleistothécia et ascospores jaunes ; phialides présentant des spores asexuées	<i>Eurotium</i>
CC.	Cleistothécia de couleur autre que jaune	<i>D</i>
D.	Cleistothécia enveloppés de petites cellules stériles (15-25µm) ; spores asexuées sur les phialides	<i>Emericella</i>
DD.	Cleistothécia blancs ou peu colorés ; aleuriospore unique ou en courtes chaînes	<i>Monascus</i>
E.	Asques présents en l'absence de cleistothécia ; pas de spores asexuées	<i>Eremascus</i>
EE.	Présence de spores asexuées mais pas d'asques	<i>F</i>
F.	Spores asexuées sur les phialides	<i>G</i>
FF.	Spores asexuées aleuriospores	<i>Chrysosporium</i>
G.	Les phialides sont portées par des vésicules (10 mm de diamètre ou plus)	<i>Aspergillus</i>
GG.	Les phialides sont portés par de petites vésicules (moins de 10 mm de diamètre)	<i>H</i>
H.	Phialides portés irrégulièrement ; colonies marron	<i>Paecilomyces</i>
HH.	Phialides portés par de petites vésicules ou en grappe compacte	<i>Penicillium</i>

Dénombrement des flores

Dénombrement des levures et moisissures est réalisé sur milieu PDA à pH 3.5 éventuellement additionné d'antibiotiques ou sur milieu OGA, par ensemencement en surface et après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C.

ANNEXE 3 . MALADIES CONTRACTEES PAR CONSOMMATION D'ALIMENTS SALES OU PAR CONTAMINATION DE PLAIES EN MILIEU MARIN

C'est peut-être à travers les toxi-infections alimentaires dues à la consommation poissons et de fruits de mer que l'ensemble des pathologies dues à des micro-organismes halotolérants voir halophiles sont le mieux appréhendés (puisque issus directement d'un environnement salé).

Aux Etats-Unis, de 1983 à 1992, les poissons et fruits de mer occupaient le troisième rang parmi les catégories d'aliments responsables de toxi-infections alimentaires. S'agissant de la consommation de poissons, les vecteurs ou agents les plus souvent incriminés étaient des poissons scombridés, des ciguatoxines, des bactéries et d'autres agents indéterminés ; concernant les mollusques et crustacés, les toxi-infections étaient dues à des agents indéterminés, aux agents de l'intoxication paralysante des mollusques et crustacés, à *Vibrio spp.* et à d'autres bactéries, suivis par le virus de l'hépatite A.

On dénombre au moins dix genres de bactéries responsables de toxi-infections alimentaires transmises par les fruits de mer. Au cours des 25 dernières années, les agents bactériens associés à une contamination fécale n'ont représenté que 4 % des maladies liées à la consommation de mollusques et crustacés, tandis que les bactéries endogènes représentaient 20 % des infections alimentaires et étaient responsable de 99 % des décès. La plupart de ces bactéries appartiennent à la famille des *Vibrionaceae* qui comprend les genres *Vibrio*, *Aeromonas*, et *Pleisomonas*. En général, *Vibrio spp.*, n'est pas associé à des contaminations fécales ; aussi n'y a-t-il pas de corrélation entre les indicateurs de cette contamination et la présence de *Vibrio*. Les virus sont la principale cause de toxi-infections associées à la consommation de mollusques et de crustacés : par exemple, entre 1981 et 1992, sur 196 foyers signalés dans l'Etat de New York, 33 % étaient dus au virus de *Norwalk* et 62 % à des virus gastro-intestinaux (petits virus à structure arrondie). De plus, plusieurs maladies résultent d'une efflorescence toxique des algues, du développement de bactéries endogènes et de diatomées responsables d'intoxication neurotoxique (neurotoxic shellfish poisoning), d'intoxication paralysante (paralytic shellfish poisoning), d'intoxication diarrhéique (diarrhoetic shellfish poisoning), d'intoxication avec effets d'amnésie (amnesic shellfish poisoning), ainsi que de ciguatera. D'après les estimations actuelles, on dénombre 20 000 cas de ciguatera chaque année dans le monde.

L'intoxication par l'histamine (intoxication par les scombridés) est la première cause de toxi-infection alimentaire associée à la consommation de poissons et de fruits de mer. La scombrottoxine est d'origine bactérienne avec, à la source, des vibrions halophiles induisant des niveaux élevés d'histamine. L'intoxication par l'histamine varie selon les régions géographiques, et plusieurs espèces sont impliquées, notamment le thon, le mahi-mahi, le tassergal, la sardine, le maquereau, la sériole et l'ormeau. Une température excessive est reconnue comme le principal facteur favorisant l'intoxication par l'histamine.

Dans la pratique, il ne faut pas négliger l'étude des indicateurs fécaux pour évaluer le niveau relatif de contamination. Toutefois, les espèces à l'origine des principales intoxications par les fruits de mer ne peuvent être détectées par le simple recours à ces indicateurs fécaux. Pour protéger la santé publique, une surveillance régulière, basée sur de nouvelles techniques spécifiques à un agent pathogène, telle que l'amplification en chaîne par polymérase, devrait être mise en oeuvre. Ces techniques, ajoutées à l'évaluation des risques et à la méthode de l'analyse des risques, points critiques pour leur maîtrise, permettront de garantir l'innocuité des poissons et des fruits de mer pour l'homme.

Nous allons à présents nous intéresser successivement aux maladies d'origine virales, bactériennes, algales contractées par consommation d'aliments salés ou par contamination de plaies en milieu marin (49).

1 – Maladies virales

En Europe, en dehors de l'hépatite infectieuse et de la poliomyélite, le rôle des virus trouvés dans les aliments est mal connu car :

- Les virus sont difficiles à déceler ;
- Ils sont généralement en faible quantité mais la dose virale infectante n'est pas précise ;
- Ils sont souvent inactivés par les processus technologiques ;
- Ils ne se multiplient pas dans les aliments. Leur survie est plus ou moins longue en fonction de leur nature ;
- Les nombreux troubles digestifs rapportés et dont l'agent étiologique n'a pu être identifié doivent-ils tous être rapportés à des virus ? Les gastro-entérites non bactériennes sont-elles toutes virales ? Par ailleurs d'autres facteurs banals peuvent intervenir pour déclencher des troubles (changement de régime, malabsorption, intolérance, substances laxatives, peur, etc.).

Nous nous intéresserons essentiellement aux maladies virales contractées par consommation de poissons et de fruits de mer.

a - Informations générales sur les virus

On recense plus de 110 virus appelés, « entérovirus », excrétés dans les fèces humaines (30). Ils survivent à basses températures et sont inactivés à haute températures. En conséquence, la plupart des d'hépatites sont observés en hiver et en début de printemps. Les virus survivent très longtemps dans l'eau de mer ; on a d'ailleurs montré qu'ils peuvent survivre jusqu'à 17 mois dans des sédiments marins(30) ; ces derniers constitueraient une sorte de réservoir à virus. Une tempête, les remous provoqués par les hélices de bateaux ou toute autre turbulence (29) suffiraient à remettre les virus en suspension (43). Les virus isolés depuis ces sédiments sont aussi infectieux pour l'homme que pour l'animal, les sédiments jouant le rôle de réservoir.

Des virus ont isolés de clams, d'huîtres, de moules, de crabes, de langouste et homards, de coques et de conques. Les mollusques filtreurs concentreraient les virus. Ces derniers ne se multiplient pas chez les bivalves mais sont accumulés dans l'hépatopancréas.

Les coquillages carnivores comme les crabes pourraient se contaminer par contact avec l'eau environnante souillée et ou par consommation de bivalves. Les virus sont généralement retrouvés chez les crabes à des concentrations inférieures à celle des eaux environnantes . Les plus fortes teneurs correspondent aux parties non comestibles du crabe (31).

b - Hépatite A

- Description

Le virus de l'hépatite A est une particule de 27 nm de diamètre possédant une simple hélice d'ARN. La première toxi-infection incriminant les fruits de mer recensée date de 1955 (en Suède). La consommation de fruits de mer n'a jamais été incriminée pour l'hépatite B même si des antigènes viraux ont été isolés sur des clams. En climat tempéré, les pics d'hépatite sont observés en début ou en fin d'hiver.

- Espèces contaminantes

Les clams cuits ou crus (24), les huîtres, les moules (52), ont été impliqués dans les épidémies d'hépatite A (27).

- Symptômes et traitement

Après une incubation de 4 semaines environ (entre 2 et 4 semaines), des premiers signes de faiblesse accompagnés de fièvre, malaise et de douleurs abdominales apparaissent. Puis, une jaunisse survient accompagnée ou non par des émissions d'urine noire. Des cas relativement bénins sont observés (forme asymptomatique fréquente chez les jeunes enfants), mais aussi des cas plus graves nécessitant une hospitalisation. Le taux de mortalité est relativement faible (< 0.1 %) ; les décès touchent essentiellement les personnes âgées et les individus atteints de maladies concomitantes.

- Détection et prévention

Le virus de l'hépatite A serait exceptionnellement résistant à la chaleur. L'inactivation du virus serait obtenue après chauffage 19 minutes à 140 °F. Ainsi, la préparation classiques des Mollusques cuits (cuisson jusqu'à ouverture des coquilles) ne permettrait pas l'inactivation du virus.

c - Norwalk virus

- Description

Le caractère pathogène de ce virus a été découvert à Norwalk (Ohio) en 1968 lors d'une épidémie de gastro-entérites. Il est actuellement considéré comme la cause principale de gastro-entérites non bactériennes : selon le CDC, de 1976 à 1980, 42 % des épidémies de gastro-entérites non bactériennes seraient dues au virus de Norwalk (29).

- Espèces contaminantes

Essentiellement les clams, les huîtres et les coques (37).

- Symptômes et traitement

Après une durée d'incubation de 40 heures (entre 12 et 72), le sujet ressent des nausées puis est sujet à des vomissements, diarrhées et douleurs abdominales plus ou moins associés à de la fièvre. Dans la plupart des cas la gastro-entérite régresse spontanément en moins de 48 heures, mais elle peut persister jusqu'à une semaine.

d - Poliovirus

- Description

C'est un des virus le plus fréquemment isolé de fruits de mer aux Etats-Unis dans la mesure où les enfants américains sont pour la plupart vaccinés (44). Le vaccin est constitué de virus vivants mais atténués qui se répliquent dans l'intestin sans répercussions cliniques graves. Les enfants ainsi immunisés excrètent du virus (de 10^3 à 10^6

a – 3 Nature et importance relative

La nature de l'agent responsable n'est pas toujours connue. Les anadémies pour lesquelles le micro-organisme responsable a été identifié ne représentent que 35 à 50 % des cas.

En ce qui concerne la fréquence relative de chaque germe (tableaux XXIII et XXIV) les Salmonelles occupent la première place dans le monde entier. Elles sont à l'origine de plus de 50 % des accidents de toxi-infection. Viennent après dans un ordre qui peut varier selon les pays et d'une année à l'autre : les Staphylocoques, les Shigelles, *Clostridium perfringens* et très loin derrière *Cl. Botulinum*. Depuis quelques années, certaines affections font émergence. Ce furent d'abord celles à *Bacillus cereus* puis aujourd'hui celles à *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* et *Campylobacter jejuni*. D'autres germes sont signalés de façon épisodique.

Tableau XXIII - Fréquence relative des divers agents étiologiques identifiés dans 592 anadémies aux USA entre 1972 et 1976 (9).

	Nombre de victimes	Nombre d'anadémies	Nombre de morts
Salmonelles	12 583	170	17
Staphylocoques	9 782	168	
<i>CL. perfringens</i>	3 388	55	4
Shigelles	2 372	23	
Virus	1 087	22	
<i>V. parahaemolyticus</i>	927	9	
Trichines	373	65	3
<i>Y. enterocolitica</i>	286	1	
<i>Cl. botulinum</i>	146	72	22
<i>B. cereus</i>	121	7	
Total	31 065	592	46

Tableau XXIV - Germes responsables des anadémies de toxi-infections déclarées en France de 1970 à 1977 (9).

Total 484 anadémies	Germes identifiés dans 321 cas	
Salmonelles, Shigelles	136	4 morts
Staphylocoques	120	3morts
<i>Cl. botulinum</i>	29	7morts
Germes divers, associations	19	
<i>Cl. perfringens</i>	17	

Mais l'importance tient aussi à la gravité des symptômes et à la mortalité. De ce point de vue *Clostridium botulinum* arrive de loin en tête. Plus de 10 % des cas sont mortels. Viennent ensuite les Salmonelles et les Shigelles. Les symptômes sont graves, la maladie et la convalescence longues. Un peu moins de 0.1 % des cas sont mortels. Les autres germes peuvent provoquer des symptômes spectaculaires (Staphylocoques ou *Cl.perfringens*), mais l'issue est rapidement favorable.

a – 4 Pathogènes

0.98 < Aw

Pour de telles valeurs de A_w , les bactéries pathogènes se multiplient rapidement et le plus souvent n'entraînent que de faibles modifications organoleptiques. Le risque est majeur lorsque que le procédé de conservation de l'aliment inhibe la flore compétitive tout en favorisant la croissance des pathogènes. Par exemple la préparation et surtout le maintien à haute température de viande contenant des spores de *Clostridium perfringens*.

Salmonella spp. se multiplie bien dans de nombreux aliments appartenant à cette catégorie. Comme la plupart des *Entérobactérieae*, elles entrent rapidement en compétition avec la flore présente à moins que d'autres bactéries compétitrices abaissent rapidement le pH. *Clostridium botulinum* représente un danger pour les aliments insuffisamment chauffés. Une putréfaction et une odeur rance accompagnent généralement la contamination des produits protéiques, mais les aliments plus acides ou moins riches en protéines ne sont que peu altérés par la multiplication et la production de toxines.

Vibrio parahaemolyticus, généralement associé aux fruits de mer, est sensible au froid et à la chaleur mais présente une croissance rapide en présence de conditions favorables de pH, de température et de A_w . Comme précédemment il ne cause que peu de modifications organoleptiques aux fruits de mer, même à concentration infectieuse. *Staphylococcus aureus* est un médiocre compétiteur dans la plupart des aliments. Les moisissures se développent bien mais si l'aliment est acide l'attaque bactérienne sera privilégiée.

0.93 < Aw < 0.98

A ces valeurs, la croissance de nombreuses bactéries (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.*, *Vibrio parahaemolyticus*) est entravée. La multiplication des Salmonelles est réduite de moitié à $A_w = 0.97$ et à un quart à $A_w = 0.96$. En l'absence des meilleures conditions de pH et de température, la croissance de ces bactéries est inhibée à $A_w = 0.96$. Cependant à $A_w = 0.94$ la croissance des staphylocoques n'est réduite que de moitié. Ces derniers constituent donc le danger principal pour cette gamme d'aliments. Les staphylocoques sont ainsi les premiers incriminés lors d'intoxication à partir produits carnés légèrement salés.

Dans ces conditions, le rôle pathogène des champignons devient non négligeable. Le risque du à la production de mycotoxines est alors plus important pour ces aliments que pour ceux ayant une A_w plus élevée.

$$0.85 < A_w < 0.93$$

Pour cet éventail de valeurs de A_w on retrouve *Staphylococcus aureus* comme pathogène majeur. Pour $A_w = 0.94$ sa prolifération est réduite de moitié par rapport à celle obtenue dans les conditions optimales alors que la plupart de ces compétiteurs se multiplient lentement (Scott d'après -Baird-Parker A.C. *et al.* (1)-). Bien que la production d'entérotoxines dans des aliments n'a pas été recensée en deçà de $A_w = 0.93$ (Troller et Stinson -d'après Baird-Parker A.C. *et al.* (1)-), la formation d'entérotoxine A a été démontrée pour $A_w = 0.867$ (30 °C) et pour $A_w = 0.887$ (25 °C) après deux semaines dans un bouillon salé (Lotter et Leistner -d'après Baird-Parker A.C. *et al.* (1)-). Ainsi la formulation des aliments semi humides est prévue pour obtenir une A_w d'environ 0.85 pour inhiber le développement de ce dernier ; un antimycosique est également ajouté pour limiter l'attaque fongique. Certaines moisissures sont capables de produire des mycotoxines sur l'ensemble de cette plage de valeurs de A_w .

$$0.60 < A_w < 0.85$$

La plupart des moisissures se développant à ces valeurs de A_w produisent des toxines.

Pathogènes survivant mais ne se développant pas pour de basses valeurs de A_w

Les microorganismes pathogènes peuvent rester longtemps à l'état quiescent dans de nombreux aliments à A_w faible et plus particulièrement dans les produits séchés. La seule méthode « d'assainissement » de ces aliments est le chauffage. Mais, les aliments fortement salés sont létaux à la plupart des pathogènes. Par exemple, *Salmonella* est rapidement détruite dans les saucisses. Leur destruction est également rapide dans la saumure à température ambiante, mais elle survient bien dans les saumures réfrigérés.

Le risque est majeur après réhydratation de tels aliments. Il est donc nécessaire d'assurer la stabilité microbienne de ces aliments par un chauffage approprié et une réfrigération à une température inférieure à 7°C.

a – 5 Aliments responsables

L'aliment responsable est identifié dans environ deux cas sur trois. Il s'agit le plus souvent d'un aliment d'origine animale (tableau XXV page 119). Les viandes en l'état interviennent assez peu par rapport aux produits manipulés, transformés, tels que viandes hachées, farce, produits de charcuterie. Les viandes de volailles découpées peuvent offrir des risques. Les œufs sont souvent contaminés. Le lait en nature set rarement à l'origine de toxi-infections mais les pâtisseries à la crème et certaines crèmes glacées sont souvent accusées. Les coquillages concentrent facilement les germes pathogènes.

La nature des aliments responsables s'explique par le fait qu'il est nécessaire, sauf exception, d'associer à une contamination les facteurs favorables à la prolifération bactérienne.

On retrouve donc parmi les aliments les plus fréquemment en cause certains aliments dans lequel le salage intervient comme moyen de conservation.

Tableau XXV - Aliments responsables des anadémies de toxi-infection déclarés en France de 1970 à 1977 (9).

Total : 484	Aliments précisés dans 179 cas
Moyenne annuelle : 60	Nombre des malades : 2 227
Viande, charcuterie, salaison, volaille	68
Plats cuisinés (dont langue 16)	36
Pâtisseries	27
Œufs, ovoproduits, mayonnaise, crème glacée	17
Lait, produits laitiers, fromages	11
Conserves industrielles	4
Conserves familiales	4
Eau	3

a – 6 Facteurs épidémiologiques divers

Par ordre d'importance décroissante, au cours des enquêtes épidémiologiques d'anadémies collectives il à été relevé les facteurs suivants :

- chaîne du froid non respectée surtout après cuisson (aliment préparé trop longtemps à l'avance)
- cuisson inadéquate, insuffisante ;
- défaut de nettoyage et de désinfection ;
- défaut d'hygiène du personnel ;
- intercontamination ;
- matières premières défectueuses ;

Dans l'ensemble un défaut de formation et de motivation du personnel constitue la toile de fond des anadémies collectives.

Il faut noter que la fréquence des toxi-infections d'origine alimentaire est importante dans les pays qui jouissent d'un niveau d'hygiène élevé.

En dehors d'un recensement plus efficace des cas, certaines raisons peuvent être invoquées, en particulier :

- habitudes alimentaires : consommation de produits peu cuits ;
- production industrielle du bétail ;
- production industrielle des denrées manipulées ;
- développement de la restauration collective ;
- intensification du commerce international de denrées contaminées
- augmentation des voyages personnel internationaux ;

- et enfin, sans être exhaustif, une hygiène trop poussée éliminant la flore bactérienne capable d'inhiber la croissance des germes pathogènes ou de dénaturer l'aliment de telle sorte qu'il soit rejeté par le consommateur avant d'être dangereux. Un niveau d'hygiène élevé exige une compétence élevée des ouvriers tout au long de la chaîne dont tous les maillons doivent être solides.

b – Etude particulière

b – 1 Toxi-infections

b – 1 – 1 Salmonelloses

- **L'Agent**

@ Pouvoir pathogène

Il existe de très nombreux sérotypes, environ 2000. Les Salmonelles sont toutes potentiellement pathogènes pour l'homme ou les animaux. Certaines ne sont pathogènes que pour une espèce, d'autres peuvent s'attaquer à de nombreuses espèces. C'est le cas de *Salmonella typhimurium* qui atteint toutes les espèces à sang chaud. Caractère pathogène pour l'homme :

On distingue deux sortes d'affections :

- le syndrome typhoïde correspondant à une généralisation de la salmonelle dans l'organisme (*S. typhimurium* et *S. paratyphimurium A, B et C*)
- le syndrome gastro-entérique toxi-infectieux

Les salmonelles agissent en se multipliant dans le tube digestif et en sécrétant des toxines qui agissent au niveau périphérique comme central.

Les facteurs du pouvoir pathogène

- tenant au germe : Pour les salmonelloses typhoïdes et paratyphoïdes quelques germes suffisent pour déclencher l'affection. Par contre, pour les toxi-infections, la dose infectante est généralement élevée et varie avec les sérotypes. En dessous de la dose, apparaissent les porteurs sains.

Les symptômes sont ensuite proportionnels à la dose ingérée et varient avec l'échelle de la dose infectante

● tenant au germe : la sensibilité de l'homme varie avec :

- l'âge : sensibilité accrue des nourrissons, des jeunes enfants ainsi que des vieillards.
- le sexe : il a été dit que les hommes sont plus résistants que les femmes
- l'état de santé : les malades ou les convalescents sont plus sensibles que les individus sains.
- le menu : la consommation de boissons alcoolisées préviendrait certains troubles !
- le moment de l'ingestion de l'aliment contaminé. Il a été noté que les doses infectantes sont moins élevées à jeun et surtout dans des liquides, car le bol alimentaire, dans ce cas, traverse rapidement l'estomac. De ce fait, les salmonelles ne sont ni détruites, ni choquées par son pH acide.

@ Ecologie des salmonelles

Les salmonelles assurent leur pérennité dans le tube digestif des animaux à sang chaud et à sang froid. Elles peuvent aussi se multiplier dans le milieu extérieur. Leur survie y est d'ailleurs de longue durée. De ce fait, comme pour toutes les Entérobactéries, elles seront souvent rencontrées dans les aliments soit parce qu'elles sont d'origine endogène, soit parce qu'elles seront d'origine exogène.

– *La Maladie*

@ Incubation

De 6 à 48 heures, en moyenne 24 heures.

@ Symptômes

Par ordre de fréquence et de gravité :

- Coliques
- Diarrhées : liquides, nauséabondes, en « soupe de légume », quelquefois sanguinolentes.
- Nausées : Vomissements, si un repas a été pris depuis celui responsable des symptômes.
- Fièvre, frissons, céphalées. Une hyperthermie pouvant atteindre 39.5 °C semble assez caractéristique de cette toxi-infection.
- Abattement ou tumphos

Sans traitement, les symptômes s'étalent sur 2 à 7 jours.
Le traitement est le plus souvent inutile ; un traitement symptomatique peut néanmoins être entrepris pour lutter contre la déshydratation.

La convalescence est longue, de 1 à 4 semaines, correspondant à l'élimination des toxines fixées dans les tissus. L'excrétion intermittente de salmonelles peut durer plusieurs mois (20 % des cas). Les enfants sont porteurs plus longtemps que les adultes. Les cas mortels sont peu nombreux (environ 0.1 % des cas).

– *Les Aliments responsables*

L'aliment responsable doit avoir été contaminé et permettre, par sa nature ou ses conditions de traitement ou de stockage, la prolifération des salmonelles.

En France, de 1970 à 1977, la liste des aliments vecteurs de toxi-infection à salmonelles a été établi comme suit :

1 – Viande, salaison	16
2 – Œufs, ovoproduits, mayonnaise, crème glacée	7
3 – Pâtisseries	6
4 – Poissons, produits de la mer (coquillages)	4
5 – Plats cuisinés, langue	2
6 – Eau	1
7 – Inconnu	100

En ce qui concerne les poissons la contamination viendrait plutôt des sauces. Pour les coquillages, il s'agit surtout de ceux récoltés « contre tout règlement » dans des eaux polluées ou lavés avec des eaux non potables : les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont alors les plus fréquentes.

b – 1 – 2 Listériose

- *L'Agent*

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquiste qu'on retrouve dans la terre, la végétation, les sédiments marins et l'eau. C'est une bactérie Gram +, non sporulée, motile, en forme de bâtonnet. Son métabolisme est de type anaérobie facultatif et elle peut croître entre 1 et 45 °C avec un optimum de croissance vers 30 – 37 °C. Il s'agit d'un micro-organisme halotolérant.

NB : Aw et croissance

L'Aw optimum de *Listeria* est de 0.97 mais cette bactérie peut se développer jusqu'à 0.943.

Listeria survit 132 jours à 4 °C à un Aw de 0.83 sur trypticase, soja.

Une Aw faible (environ 0.90) augmente la résistance de *Listeria monocytogenes* à la chaleur.

Listeria est capable de se développer en présence de 10 % de NaCl (d'après Staley J.T. (72)). *Listeria monocytogenes* survit 150 jours dans du NaCl pur et 545 jours dans 0.85 de NaCl.

Le temps de survie de *Listeria monocytogenes* dans 25 % de NaCl augmente quand la température baisse (24 jours à 22 °C, 132 à 4 °C).

- *L'Épidémiologie*

La listériose est une maladie infectieuse commune à l'homme et aux animaux (anthropo-zoonose)

La listériose est essentiellement observée dans les pays industrialisés sans qu'il soit possible d'affirmer si cette infection existe et n'est pas diagnostiquée, ou si elle est quasiment absente d'Afrique, d'Asie et de nombreux pays d'Amérique du Sud.

Les épidémies de *Listeria* évoluent sous forme de cas sporadiques, parfois amplifiées de petites bouffées épidémiques voire de véritables épidémies. Trois types épidémiologiques sont observés :

- les cas sporadiques
- les cas nosocomiaux survenant surtout en maternité (thermomètres, sondes d'aspiration, incubateurs).
- les épidémies d'origine alimentaire qui sont incontestablement plus fréquentes. La listériose est responsable de 20 à 30 % des mortalités dans les TIA.

On observe trois réservoirs de listériose :

- le réservoir humain avec une grande fréquence de porteurs sains.
- le réservoir animal, sachant que les animaux porteurs peuvent être une source de contamination des denrées alimentaires d'origine animale (ovins, bovins, caprins, volailles).
- le réservoir d'environnement comprenant le sol, la végétation, les eaux de surface et des égouts, les boues, les sédiments marins (61) et les aliments. Notons que les *Listeria* sont présentes dans 4 à 30 % des intestins d'humains et d'animaux.

La fréquence de cette maladie à diffusion mondiale augmente depuis plusieurs années chez l'homme sans qu'il soit encore possible de dire si l'augmentation constatée traduit l'extension réelle ou seulement une meilleure connaissance des divers aspects cliniques de l'infection, favorisant une amélioration des méthodes microbiologiques d'isolement et d'identification du germe responsable. Cette forte augmentation peut s'expliquer par :

- l'allongement des chaînes alimentaires
- le développement de la restauration collective
- la surveillance épidémiologique mieux organisée

- *Symptômes et traitement*

La période d'incubation serait comprise entre 3 et 4 semaines. La seule présence de la bactérie ne déclenche généralement pas la maladie : des souches pathogènes pour l'homme ont été isolées depuis le tractus gastro-intestinal d'individus en parfaite santé. La plupart des personnes bien portantes ne sont pas ou peu affectées par la présence de listéria.

Les victimes de listériose sévère sont généralement immuno-déprimés : personnes atteintes de cancer, drogués, alcooliques, femmes enceintes, patients souffrant de

problèmes gastriques (acidité diminuée), sidéens. La forme aiguë de la maladie peut se traduire par des avortements, des méningites, des septicémies, des encéphalites, des endocardites, des abcès ou des lésions purulentes, des malaises, de la fièvre, des vomissements, des maux de tête ou des convulsions.

- *Les Produits dangereux*

■ Les produits laitiers

Ils ont souvent été incriminés lors d'épidémies de listériose. Mais du fait de l'augmentation de l'hygiène dans ce secteur, la contamination et les risques ont fortement diminué. Toutefois la surveillance des produits laitiers reste très forte.

- les laits crus sont les plus sensibles à *Listeria monocytogenes* car ils ne subissent aucun traitement thermique et les animaux peuvent être contaminés (mammites, porteurs sains). Le taux de contamination des laits crus varie de 1 à 45 % des échantillons. Les laits pasteurisés ou stérilisés UHT sont nettement moins sujets à des contamination par *Listeria*. Le traitement thermique est suffisant pour détruire *Listeria*. Cependant, des contaminations peuvent survenir après le traitement.

- les fromages. La source majeure de contamination des fromages est le lait. Cette étape peut être maîtrisée en séparant la pasteurisation et les étapes de la fabrication des fromages.

- les yaourts (dépend du germe de fermentation), le beurre, les crèmes, les mélanges pour glaces peuvent également être contaminés.

■ Les produits de la mer

Parmi 227 souches de *Listeria monocytogenes* isolées de produits de la mer, 147 appartiennent au sérotype 1 – 2 et 80 au sérotype 4b. La présence de la bactérie est plus fréquente dans la chair de crabe, de crevette et le saumon.

■ Les produits carnés

En 1992 et 1993, 2 épisodes ou « flambées épidémiques » ont mis en cause des produits à base de viande, entraînant la sensibilisation brutale d'une profession qui se croyait relativement protégée, car les *listéria* étaient traditionnellement associées aux produits laitiers. En effet, les produits carnés sont une cause importante d'épidémie et les cas rapportés sont en augmentation et non en diminution.

- Les produits carnés crus

Le muscle de la viande, quel que soit l'espèce de l'animal, est un excellent milieu de culture pour les microorganismes. De plus, la distribution à longue distance, nationale ou internationale, est la cause de la dispersion des agents pathogènes. Des contaminations croisées peuvent se produire tout au long de la chaîne de fabrication du produit viande et ultérieurement en cuisine.

- Les produits carnés transformés

Ceci concerne les viandes cuites et les produits de charcuterie et de salaison. Les produits de charcuterie sont préparés avec un mélange de viande et de graisse de porc qui peuvent être crus (saucissons, chair à saucisse). Ces types de produits ont souvent été incriminés dans les épidémies de listériose et les *Listeria* sont présentes en proportion importante.

Les contaminations peuvent se faire par la viande utilisée qui est elle-même contaminée ou avoir lieu lors de manipulations à répétition par le personnel. Elles sont directement liées à l'hygiène du personnel, du matériel et des locaux

- On retrouve également les volailles et ovoproduits ainsi que les végétaux et dérivés comme source de contamination possible.

b – 1 – 3 Vibrioses

- **L'Agent**

Vibrio parahaemolyticus, reconnu comme important au Japon depuis 1950.

La dose minimale infectante par voie orale n'est pas connue, néanmoins il semble qu'elle se situe entre 10^6 et 10^9 germes/g.

Ce germe vit dans les mers près des côtes et des estuaires, dans les boues en hiver, remonte en surface en été et contamine alors les animaux marins.

- **La Maladie**

- Incubation : 12 à 24 heures
- Symptômes : diarrhée, coliques, nausées, vomissements céphalées, frissons.
- Aliments dangereux : produits de la mer (crabe, salade de crabe, crevettes, huîtres, poissons crus et éventuellement d'autres denrées par intercontamination

b – 1 – 4 Toxi-infection à *Clostridium perfringens*

- **L'Agent**

Clostridium perfringens peut sécréter une entérotoxine in vivo, lorsque les cultures sont en voie de sporulation. Cette toxine est rarement retrouvée dans les aliments à moins que les clostridies n'aient sporulé.

La toxine est en rapport avec la sporulation : elle est libérée par la lyse des cellules sporulées. La synthèse de la paroi de la spore est un premier stade de la toxinogénèse. La toxine peut être décelée à partir de 4 heures et s'accumule pendant une dizaine

d'heures. C'est une protéine simple (PM 36 000 ; pHi : 4.3 ; D60 : 4 min.), non inactivée par la trypsine ou la pepsine. Elle agit directement sur la paroi du tube digestif en augmentant la perméabilité capillaire, donc l'afflux liquidien dans le tube digestif et le péristaltisme (test de l'anse intestinale isolée).

En fonction des exotoxines produites α , β , ϵ et ι , on distingue 5 groupes : A, B, C, D et E. La plupart de souches incriminées dans les TIA appartiennent au groupe A. Quelquefois des souches appartenant au groupe C donnent des symptômes sévères tels que l'apparition d'une entérite nécrosante (action de β). D est parfois entérotoxique. L'entérotoxine est la même chez A, C et D.

Cl. perfringens n'est toxique que lorsqu'il est ingéré en grand nombre dans les aliments (10^6 à 10^8 germes par g)

Cependant la sensibilité du consommateur semble très variable (les personnes âgées sont fragiles).

Sur le plan écologique, *Cl. Perfringens* est un hôte habituel du tube digestif de l'homme (A – 2 à 100 % - 10^2 à 10^9 / g de fèces) et des animaux (bœuf et veau : C 90 %, A 10 %). Mais il est aussi très ubiquiste : sol, poussière, eau, etc.

- **La Maladie**

● Incubation

2 à 30 heures, en moyenne 12 heures.

La sporulation demande 12 heures dans l'intestin grêle.

Les périodes d'incubation plus courtes peuvent être expliquées par un début de sporulation dans l'aliment.

● Symptômes

La diarrhée est parfois le seul symptôme ; coliques ; quelquefois nausées, céphalées ; rarement vomissements, étourdissements, vertiges, fièvre, méléna.

Chez les jeunes, les symptômes sont souvent bénins, ils durent 12 à 24 heures. La guérison est complète en moins de 48 heures.

- **Les Aliments dangereux**

L'aliment dangereux doit :

- avoir été contaminé par des spores ce qui est fréquent ;
- être débarrassé de la flore antagoniste, ce qui est réalisé par la plupart des cuissons domestiques ;
- être favorable à la prolifération : nature protéique, anaérobie légère, entre 10 et 50 °C.

Les aliments principalement accusés sont les langues de bovins, les viandes bouillies ou légèrement rôties, les plats cuisinés, les pâtés, dont la cuisson a été réalisée à l'avance, qui n'ont pas été refroidis suffisamment vite ou qui ont été

réchauffés trop lentement et maintenus pendant trop longtemps à une température inférieure à 52 °C.

b – 2 Intoxications

b – 2 - 1 Intoxications à staphylocoques

– **L'Agent**

Les souches entérotoxiques de *Staphylococcus aureus* sécrètent plusieurs entérotoxines identifiées par des réactions sérologiques délicates à mettre en œuvre. Ce sont les toxines A, B, C1, C2, D, E et F. Ce sont des protéines de poids moléculaire compris entre 25 000 et 35 000, solubles dans l'eau et les solutions salines. Elles résistent aux enzymes protéolytiques du tube digestif. Elles sont thermostables (110 °C pendant plusieurs minutes dans un bouillon de bœuf mais seulement quelques secondes à 80 °C en présence de myosine ou de metmyoglobine). Dans les aliments, la cuisson ordinaire ne les détruit pas.

Elles agissent sur les terminaisons nerveuses du tube digestif qui stimulent le centre du vomissement.

Il faut 10^5 à 10^6 germes/g d'aliment pour escompter une quantité de toxine efficace.

Mais la sensibilité des consommateurs varie dans de grandes proportions, certains d'entre eux ne pouvant rien ressentir. Il n'y a pas d'immunité acquise chez l'homme, bien que chez l'animal il soit possible de créer une certaine résistance après plusieurs ingestions d'entérotoxine staphylococcique.

La toxinogénèse n'intéresse pas toutes les souches. Celles qui sont susceptibles de produire des toxines possèdent généralement une coagulase, une thermonucléase et une Dnase ou au moins deux de ces enzymes.

La toxinogénèse n'accompagne pas forcément la croissance bactérienne. Elle a lieu lorsque les conditions de cette dernière sont très favorables et en particulier quand la flore antagoniste est faible. *St. Aureus* se développe mal en présence d'autres germes : streptocoques, Entérobactéries, etc.

Staphylococcus aureus vit dans les cavités nasales de l'homme, dans les glandes sébacées et sudoripares, dans les bulbes pileux. Le principal site pour les mains est le bout des doigts (en relation avec l'habitude de se gratter le nez). Ce germe est à l'origine de rhumes, pharyngites, abcès, furoncles, acné, impétigo, etc. L'origine animale est possible mais plus rare. Théoriquement certains caractères biochimiques permettent de reconnaître les staphylocoques d'origine animale.

- **L'Affection**

● Incubation

Courte, de 30 minutes à 8 heures ; en moyenne 3 heures après l'ingestion.

● Symptômes

Toutes les personnes ayant consommées le même aliment ne sont pas malades. Toutes les personnes malades n'éprouvent pas forcément les mêmes symptômes ; ils varient avec l'individu et la quantité de toxines ingérées.

Les malades présentent par ordre de fréquence :

- Nausées ;
- Vomissements incoercibles, en « fusée », dominants si la période d'incubation est courte ;
- Coliques et diarrhée si la période d'incubation est plus longue (l'aliment a déjà franchi l'estomac) ;
- Etat de choc : cyanose, salivation, malaise, effort pour vomir, déshydratation, sueurs froides, hypothermie, collapsus.

Les symptômes durent 24 à 48 heures. Un traitement contre la déshydratation est parfois nécessaire.

– *Les Aliments dangereux*

Ces aliments ont été contaminés dans 95 % des cas par l'homme surtout après cuisson ; puis leur nature (pH, Aw, aérobiose), leur composition, une éventuelle contamination associée et les conditions de conservation ont permis une forte prolifération de la toxinogénèse (4 heures à 22-35 °C sont suffisantes).

Les principaux aliments accusés sont :

- Les produits de charcuterie, le jambon cuit,
- Les plats froids à base de volaille, de thon,
- Les pâtisseries, crème au lait, aux œufs, crème anglaise,
- Les ovoproduits, mayonnaise, crème glacée, produits laitiers, conserves industrielles contaminées après ouverture.

b – 2 – 2 Intoxinations à *Clostridium botulinum*

- *L'Agent*

■ Toxines

Elles ont une action nerveuse.

Elles permettent de distinguer des toxinotypes particuliers de *Clostridium botulinum*, désignés par les lettres de A à G.

- A. chez l'homme, surtout dans la partie Ouest des USA (mortalité de l'ordre de 53 %).
- B. chez l'homme, surtout en Europe et dans les régions Centre et Est des USA. Elle est légèrement moins toxique que A (mortalité de l'ordre de 10 %)
- C1 et C2. Elles sont rares chez l'homme.
- D. idem que C.
- E. Elle se rencontre chez l'homme au Japon, au Canada et en Europe du Nord.
- F. rare.
- G. rare

Toutes ces toxines ont des points communs :

- Ce sont des protéines simples : leur poids moléculaire varie de 50 000 à 900 000, en moyenne 250 000.
- Elles sont acidostables,
- Antigéniques,
- Thermolabiles
- Chlorolabiles : Cl₂ à 1 ppm dans de l'eau détruit la toxine en 5 min.

La toxine qui résiste au pH = 2 de l'estomac et qui peut être activée par la trypsine (E par exemple) traverse la paroi du tube digestif et agit sur les jonctions myoneurales, provoquant des paralysies musculaires flasques. Cette fixation se fait sur les terminaisons pré-synaptiques des nerfs cholinergiques et interfère avec la libération d'acétylcholine. Cette fixation est irréversible et, lorsqu'il y a survie, elle provoque la nécrose des jonctions myoneurales. La restauration sera lente, demandant 3 à 6 mois.

La traversée de la paroi du tube digestif se fait surtout au niveau de l'intestin grêle, mais aussi du gros intestin. Cette absorption n'est pas complète et elle varie avec les aliments.

La toxine est préformée dans les aliments ; elle est élaborée durant la phase exponentielle de croissance mais n'est libérée dans le milieu extérieur qu'après cette phase. Elle diffuse alors autour des colonies, si bien que, pour un jambon par exemple, toutes les parties ne sont pas forcément toxiques.

■ Bactéries

Elles sont pour la plupart d'origine tellurique mais il existe des porteurs intestinaux qui constituent des réservoirs et des agents de dissémination (le porc par exemple pour *Cl. Botulinum B* en Europe).

Les boues marines à proximité des côtes de certains pays recèlent le type E (qui est commun dans le tube digestif des poissons).

Le type F est rencontré chez des oiseaux des rivages marins.

Ces germes sont soit protéolytiques et gazogènes (A et B) soit non protéolytiques et non gazogènes (E en particulier).

La toxinogénèse est arrêtée aux températures inférieures à 10 °C sauf pour E, pour lequel, à 4 °C, la toxine apparaît en 4 à 5 semaines. Un pH inférieur à 4.7 est nécessaire pour garantir l'innocuité ainsi qu'une Aw < 0.93 (0.95 pour E). L'anaérobiose stricte est indispensable mais pour E la tolérance est plus grande.

La toxinogénèse semble être sous la dépendance d'un phage et elle peut disparaître de certaines souches lors du repiquage en laboratoire.

■ Spores

Elles sont terminales, caractérisées par leur grande résistance aux agents physiques et chimiques.

- ***L’Affection***

Il s’agit d’anadémies familiales ou de cas isolés.

■ Incubation

De 2 heures à 2 jours. Elle varie avec la quantité et la nature de la toxine ingérée et le type d’aliment. Si elle est inférieure à 24 heures, les symptômes seront graves et l’affection souvent mortelle.

■ Symptômes

Certains symptômes précurseurs peuvent exister tels des nausées et des vomissements, des douleurs cardiaques, des diarrhées mais souvent la digestion se fait normalement.

Les premiers symptômes qui apparaissent intéressent les yeux (défaut d’accommodation, mydriase) puis seront observés des troubles sécrétoires (salive épaisse, bouche sèche, constipation, peau sèche par défaut de sudation). Les paralysies musculaires flasques intéressent d’abord les yeux (strabisme) puis la face qui se relâche, la gorge, entraînant des difficultés de déglutition, voire de fausses déglutitions, le cou, la poitrine, les muscles des membres. Le diaphragme est le derniers atteint. La mort survient par asphyxie. La durée d’évolution est de 3 à 6 jours.

La guérison demande 6 à 8 mois. Les muscles paralysés retrouveront très progressivement et imparfaitement leur fonction.

Le traitement à l’hôpital comprend :

- l’élimination de la toxine du tube digestif.
- l’administration de l’antitoxine spécifique qui n’agit que sur la toxine circulante.
- l’usage de poumon artificiel.
- un traitement symptomatique.

- ***Les Aliments responsables***

Les aliments doivent :

- Etre contaminés par *Cl. Botulinum* d’origine tellurique ou intestinale
- Offrir des conditions suffisantes d’anaérobiose (grosses pièces comme les jambons ou aliments conditionnés en récipients étanches sans avoir été convenablement stérilisés).
- Présenter des conditions physico-chimiques (pH, Aw, Nitrites) permettant croissance, germination et toxinogénèse.
- Etre maintenus assez longtemps à une température eugénésique supérieure à 7 °C.

Parmi les aliments les plus fréquemment en cause on trouve :

- Les jambons secs et charcuteries. Durant les premiers jours de salaison, avant que le sel pénètre dans la viande, la température est supérieure à 7 °C.
- Les filets et semi-conserves de poisson présentés en conditionnement souple : le vide n’est pas rompu par la multiplication du type E. Le poisson fumé est souvent responsable (9).

3 – Par ingestion de mycotoxines ou de phycotoxines

a – Par ingestion de mycotoxines

Les mycotoxines sont des substances correspondant à des métabolites secondaires rencontrés dans les conidies, les thalles ou excrétés dans le milieu extérieur.

- Champignons vénéneux
- Intoxication par consommation d'aliments contaminés par des moisissures
- Sécrétion d'antibiotiques

Plus de 150 espèces de moisissures ont été reconnues à l'origine de de plus de 220 mycotoxines :

-Aflatoxine :

-Patulxine :

b – Ingestion de phycotoxines et intoxications alimentaires

Les phycotoxines sont des toxines produites par des algues unicellulaires du phytoplancton. Parmi plusieurs milliers d'espèces algales existant, une trentaine seulement sont toxigènes, dont la plupart appartiennent à la classe des Dinoflagellés.

Les phycotoxines produites par ces algues, peuvent atteindre des concentrations dangereuse pour le consommateur lors du transfert vers des échelons trophiques supérieurs. Plusieurs types de molécules sont responsables de cinq syndrômes d'intoxication humaine répertoriés à ce jour au niveau mondial. Le tableau XXVI page 135 résume schématiquement les espèces planctoniques incriminées et les phycotoxines produites, ainsi que les syndromes d'intoxications et les principaux vecteurs le long de la chaîne alimentaire

b – 1 Intoxications neurologiques par fruits de mer (INFM) :

Elles sont dues aux brevéttoxines produites par un dinoflagellé, *Ptychodiscus brevis*. Les souches toxigènes sont exclusivement rencontrées dans le golfe du Mexique. Les fruits de mer incriminés lors d'intoxication sont surtout les clams, mais les toxines sont retrouvées dans de nombreux bivalves.

Lors des intoxications alimentaires, les malades présentent des troubles neurologiques (paresthésies, inversion des sensations de chaud et de froid) accompagnées de nausées. Ces symptômes régressent et disparaissent en quelques jours.

Les brevéttoxines provoquent une excitation prolongée des canaux sodium.

b – 2 Ciguatera :

Le principal producteur de toxines ciguatériques est *Gambierdiscus toxicus*, Dinoflagellé benthique corallien, qui produit essentiellement la maïatoxine et accessoirement quelques ciguatoxines.

Les régions d'endémie de la ciguatera couvrent de nombreuses mers tropicales, sur les récifs coralliens. En France, elle sévit dans les DOM-TOM (Antilles, Polynésie, Réunion).

La ciguatera est un ichtyosarcotisme, c'est à dire une intoxication alimentaire transmise par les poissons. Dans les poissons, les toxines se trouvent surtout dans les viscères, mais les muscles peuvent contenir suffisamment de poison pour provoquer des intoxications.

Les manifestations cliniques apparaissent généralement moins de 12 heures après ingestion de poissons ciguatoxiques. Le tableau symptomatologique comprend des troubles neurologiques (paresthésie, sensibilité thermique, vertiges, troubles de la vision), des troubles gastro-intestinaux (diarrhées, vomissements) et des troubles cardiaques (bradycardie, hypotension). Certains symptômes peuvent persister plusieurs mois et devenir récurrents. La mort est exceptionnelle. Les ciguatoxines sont très toxiques ; on estime à 0.1 µg la quantité suffisante pour provoquer une intoxication.

Les ciguatoxines stimulent l'entrée du sodium au niveau des canaux sodiques des membranes excitables (idem brévéttoxines).

b – 3 Intoxications amnésiques par les fruits de mer (IAFM) :

Elles sont provoquées par l'acide domoïque (acide aminé de faible poids moléculaire) produit par des Diatomées du genre *Nitzschia*, largement répandu sur de nombreuses côtes, notamment sur le littoral français. Toutefois, les souches toxigènes n'ont été signalées qu'au Canada et aux Etats-Unis. Les vecteurs sont essentiellement des coquillages.

Les atteintes sont essentiellement neurologiques (nausées, pertes d'équilibre et troubles du système nerveux central, notamment pertes de mémoire), accompagnées de troubles gastro-intestinaux. Peut être mortelle.

L'acide domoïque est un analogue du glutamate, il se fixe sur des récepteurs spécifiques du cerveau et exerce une action neuro-excitatrice.

b – 4 Intoxications diarrhéiques par fruits de mer (IDFM) :

Les toxines impliquées dans les IDFM sont classés en trois groupes structuraux : l'acide okadaïque et ses dérivés, les dinophysistoxines ; les pecténotoxines ; les yessotoxines. Elles sont produites par des Dinoflagellés des genres *Dinophysis* et *Prorocentrum*.

Les IDFM sont signalées au Japon, en Europe et au Canada. En France, *Dinophysis* prolifère de façon épisodique en Bretagne sud, en Normandie en baie d'Arcachon, dans les Charentes et le golfe du Lion.

Les toxines sont transmises à l'homme par les mollusques bivalves qui peuvent rester toxiques plusieurs semaines après la fin des efflorescences (de mai à août).

Les signes d'intoxication apparaissent le plus souvent entre 30 minutes et 45 heures après le repas et peuvent persister trois jours. Le tableau clinique comprend des diarrhées accompagnées de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements et de troubles secondaires (céphalées, vertiges, tachycardies).

Les phycotoxines diarrhéiques augmentent, d'une manière analogue à la toxine cholériques, la phosphorylation des protéines par inhibition de la sérine/thréonine protéine phosphatase, enzyme responsable de la déphosphorylation. Cette action perturbe le flux d'ions sodium dans les cellules intestinales. Une étude japonaise a mis en évidence le rôle de promoteurs tumoraux des phycotoxines diarrhéiques dans certains cancers.

b – 5 Intoxications paralytiques par fruits de mer (IPFM) :

La saxitoxine et ses dérivés sont produites par des Dinoflagellés nageurs du genre *Alexandrium* et par *Gymnodinium catenatum* et *pyrodinium bahamense var. compressa*. D'autres sources de saxitoxines sont rapportées : une algue géante d'Okinawa, *Jania sp* et une algue d'eau douce, *Aphanizomenon flos-aquae*. Toutes ces micro-algues ne produisent pas l'ensemble des 18 phycotoxines paralysantes dans les mêmes proportions.

Les espèces productrices de phycotoxines paralysantes sont implantées sur de nombreux sites côtiers. *Alexandrium sp* et *gymnodinium catenatum* sévissent dans les régions tempérées ; les eaux tropicales et équatoriales subissent les proliférations de *Pyrodinium bahamense* mais aussi d'*Alexandrium tamarense*, espèce particulièrement répandue. Le littoral français connaît depuis quelques années des efflorescences épisodiques d'*Alexandrium minutum* : en Bretagne nord (région des abers et baie de Morlaix) et en rade de Toulon.

Les bivalves sont les principaux vecteurs d'intoxication pour l'homme. Après la disparition des algues, les coquillages éliminent naturellement les phycotoxines.

Les premiers signes d'intoxication chez l'homme (paresthésie des lèvres, des doigts et des orteils, céphalées, vertiges, nausées) apparaissent 30 minutes après l'ingestion. L'engourdissement s'étend ensuite au visage, au cou et aux membres. La parole devient incohérente et les mouvements désordonnés. Par la suite la paralysie se généralise, accompagnée d'une sensation de légèreté et de difficultés respiratoires. Dans les cas extrêmes, le décès par insuffisance respiratoire survient entre 2 et 24 heures.

La saxitoxine et ses analogues inhibent le potentiel d'action des cellules excitables par blocage sélectif des canaux sodium. Le site de fixation des phycotoxines paralysante sur la pompe à sodium semble être commun avec la tétrodotoxine, ichtyotoxine de certains poisson comme le fameux fugu japonais, mais différent du site d'action des brevéttoxines et des ciguatoxines.

Il n'existe pas de statistiques mondiales précise sur la véritable incidence des empoisonnements par fruits de mer ; le nombre de cas recensés est souvent en deçà du nombre réel d'intoxications.

En ce qui concerne la France, les risques peuvent être illustrés par les quelques exemples suivants. Pour la ciguatéra, le taux d'incidence moyen pour 10 000 habitants est évalué entre 51 et 100 pour la Polynésie française et entre 11 et 50 pour la Nouvelle-Calédonie et les petites Antilles. Pour les intoxications paralytiques, outre 3 cas douteux en 1907 et 1911, la France n'a connu que 33 empoisonnements non mortels en 1976 dus à la consommation de moules appertisées provenant d'Espagne. Malgré l'apparition en 1988 d'un *Alexandrium toxinogène* sur nos côtes, aucune intoxication n'a été déplorée après consommation de productions françaises, grâce à l'intervention des pouvoirs publics. Par contre les intoxications diarrhéiques demeurent un problème préoccupant en France métropolitaine (46).

Tableau XXVI – Phytoplancton et phycotoxines (46).

4 – Par contamination de plaies en milieu marin

Des micro-organismes marins peuvent contaminer des plaies et être à l'origine de cellulite (rougeur et gonflement), d'erysipèle et de phénomènes de nécrose. La cellulite et l'erysipèle se guérissent relativement bien, par contre les nécroses sont plus difficiles à traiter et nécessitent le plus souvent une intervention chirurgicale.

Tout un ensemble de bactéries (aéro ou anaérobies) peuvent provoquer ces infections. Elles se propagent à partir de plaies et les troubles les plus sévères sont constatés chez des personnes atteintes d'affections comme le diabète, de problèmes circulatoires ou encore immunodéprimés (par une thérapeutique ou par le sida). Lorsque les bactéries prolifèrent, la pression en O₂ diminue localement. Ce phénomène est amplifié lors de nécrose puisque le système artériel n'est plus efficace.

a - Bactéries

Vibrio vulnificus est l'agent bactérien le plus fréquemment incriminé. Chez l'individu immuno-déprimé (cirrhoses, thérapeutique anti-cancéreuse, sidéens) l'infection de plaies exposées à l'eau de mer ou à des eaux saumâtres peut provoquer rapidement cellulite, nécrose vasculaire, ulcères, myosites et septicémies. Cela se produit dans la plupart des cas lors de coupures suite à la manipulation de crabes ou de coquillages. Les symptômes apparaissent brutalement et peuvent être associés à une diarrhée ou à une C.I.V.D.. La mort survient dans environ 50 % des cas. Parfois des boursouffures ainsi que des lésions cutanées peuvent se manifester à distance de la plaie initiale.

Le traitement de la vibriose nécessite le plus souvent un parage chirurgical associé à un traitement symptomatique et à un traitement antibiotique, généralement à base de tétracycline, chloramphénicol, pénicilline ou d'aminoglycosides.

Vibrio parahaemolyticus, bien que plus fréquemment en cause lors de toxi-infections alimentaires, peut être à l'origine d'infection de plaies, des oreilles et de septicémies.

Erysipelothrix rhusiopathiae, bâtonnet Gram +, est présent chez de nombreux animaux domestiques et sauvages (dont les poissons). L'erysipèle est reconnu comme étant une cause importante de maladie du travail dans l'industrie de la pêche, pour les boucher et pour toutes les personnes en contact avec des fruits de mer vivants ou des viandes crues. Le point de départ de l'infection correspond souvent à une abrasion, une égratignure ou une perforation suite à la manipulation de matériel contaminé. Le sujet ressent douleur, chaleur et raideur dans les doigts ou la main, puis une induration d'aspect violacé et irrégulier apparaît. La période d'incubation varie entre 1 et 4 jours. La guérison est lente, environ 3 semaines avec un traitement approprié. Les complications par dissémination correspondent à une endocardite. L'antibiothérapie est à base de pénicilline, de clindamycine ou céphalotine. Le port de gants constitue une des seules mesures préventives.

Aeromonas hydrophilia est une bactérie Gram – très commune dans le sol et les eaux (mers et eaux douces). Elle provoque cellulite, ostéomyélite, des épisodes de diarrhée, des septicémies (echtyma gangréneux), des myosites nécrosantes et sélectionne des hôtes responsables de cirrhose. L'évolution classique correspond à l'apparition rapide d'une cellulite après blessure.

Mycobacterium marinum est un agent atypique de la tuberculose qui se développe bien en eaux douces, dans les piscines, les aquariums mais également dans l'eau de mer. L'infection peut se contracter en manipulant des poissons (épines dorsales) et des crustacés (pincement). Il s'agit d'une bactérie phototrope qui présente une croissance optimale à 32°C. Après 2 à 8 semaines d'incubation se développent une suppuration et un granulome qui évolue parfois en ulcère. L'infection peut alors se propager en empruntant les voies lymphatiques et les gaines tendineuses. De l'Ethambutol ou de la Rifampine sont utilisés dans le traitement. La durée du traitement est controversée car même si la guérison clinique survient en 4 à 6 semaines certains médecins préconisent de prolonger le traitement de 18 mois.

b – Protozoaires

- Amibes

Acanthamoeba et *Pfiestria piscicida* peuvent infecter l'homme chez qui elles provoquent douleurs, pertes de mémoires sévères et troubles mentaux.

Les *Acanthamoeba* vivent en eau douce mais peuvent également proliférer en solution saline. Elles peuvent causer la mort par méningite ou des kératites par contact. Malgré un traitement à l'Amphotéricine B et à l'oxygène hyperbar, la mort survient dans 96 % des cas et concerne surtout enfants et adolescents.

- *Giardia lamblia* et *Endamoeba histolytica* pourraient également sévir en milieu salé.

c – Virus

Le virus de l'hépatite A peut également se contracter en manipulant des fruits de mer. Il provoque des symptômes analogues à ceux observés après contamination orale.

BIBLIOGRAPHIE

- . 1 BAIRD-PARKER A. C., BRYAN F.L., CHRISTIAN J.H.B., CLARK D.S., OLSON J.C., ROBERTS T.A. *et al.* *Microbial Ecology of foods*. Vol. I. New York : Academic Press, 1980, 70-85.
- . 2 BAIRD-PARKER A. C., BRYAN F.L., CHRISTIAN J.H.B., CLARK D.S., OLSON J.C., ROBERTS T.A. *et al.* *Microbial Ecology of foods*, Vol. II. New York : Academic Press, 1980, 383-394.
- . 3 BATH C. et DYALL-SMITH M.L. His1, an archaeal virus of the Fuselloviridae family that infects *Haloarcula hispanica*. *J. Virol.*, 1998, **72**(11), 9392-9395.
- . 4 BONNETE F., MADERN D., ZACCAI J. Stability against denaturation mechanisms in halophilic malate dehydrogenase "adapt" to solvent conditions. *J. Mol. Biol.*, 1994, **244**, 436-447.
- . 5 BONNIFACY P. *Contribution a l'étude des productions et des utilisations du sel en France*. Thèse Med. Vét., Toulouse., 1984, 226 p.
- . 6 BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P. *et al.* *Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle*. 2^e ed. : MASSON, 1990, 160.
- . 7 BRITTON K.L., STILLMAN T.J., YIP K.S., FORTERRE P., ENGEL P.C., RICE D.W. Insights into molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarium*. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**(15), 9023-9030.
- . 8 BROWN J.W., DANIELS C.J., REEVE J.N. Gene structure, organisation and expression in archaeobacterium. *CRC Crit. Review in Microbiology*, 1989, **16**(4), 287-338.
- . 9 CARLIER V., ROZIER J., BOLNOT F. *Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 220 p.
- . 10 CARLIER V., AUGUSTIN J.C. *Le contrôle microbiologique des denrées alimentaires*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service d'Hygiène et Industries des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, 1996, 34 p.
- . 11 CAUMETTE P., BAULAIGUE R., MATHERON R. Characterization of *Chromatium salexigens* sp. Nov., a halophilic Chromatiaceae isolated from mediterranean salinas. *System. Appl. Microbiol.*, 1988, **10**, 284-292.
- . 12 CAUMETTE P., BAULAIGUE R., MATHERON R. Isolation and characterization of *Desulfovibrio halophilus* sp. Nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from solar Lake (Sinai). *System. Appl. Microbiol.*, 1991, **13**, 33-38.

- . **28 GERBA C.P., GOYAL S.M., LABELLE R.L., CECH I., BODGAN G.F.** Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *American Journal of Public Health*, 1979, **69**(11), 1116-1119.
- . **29 GERBA C.P., ROSE J.B., SINGH S.N.** Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. *Critical Reviews of Environmental Control*, 1985, **15**(3), 213-236.
- . **30 GOYAL S.M.** Viral pollution of the marine environment. *Critical Reviews of Environmental Control*, 1984, **14**(1), 1-32.
- . **31 GOYAL S.M., ADAMS W.N., O'MALLEY M.L., LEAR D.W.** Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the Middle Atlantic region. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, **48**(4), 758-763.
- . **32 GUEZENNEC J., PIGNET P., LIJOUR Y., GENTRIC E., RATISKOL J., COLLIEC-JOUAULT S.** Sulfation and depolymerisation of a bacterial exopolysaccharide from hydrothermal origin. *Carbohydrate Polymers*, 1998, **37**, 19-24.
- . **33 GUILBERT S.** Additifs et agents dépresseurs de l'activité de l'eau. In : MULTON J.L. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires* : 2^e ed. Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaire, 225-252.
- . **34 GUIRAUD J.P.** *Microbiologie alimentaire*. Paris : Dunod, 635 p.
- . **35 GUIXA-BOIXAREU N., CALDERON-PAZ J.I., HELDAL M., BRATBAK G., PEDROS-ALIO C.** Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquatic Microbial Ecology*, 1996, **11**, 215-227.
- . **36 GUNDE-CIMERMAN N., ZALARB P., DE HOOGE S., PLEMENTASD A.** Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, **32**(3), 235-240.
- . **37 GUNN R.A., JANOWSKY H.J., LIEB S., PRATHER E.L., GREENBERG H.B.** Norwalk virus gastroenteritis following raw oysters consumption. *American Journal of Epidemiology*, 1982, **115**(3), 348-351.
- . **38 HENDERSON R., BALDWIN J.M., CESKA T.A., ZEMLIN F., BECKMAN E., DUNNING K.H.** Model for the structure of Bacteriorhodopsin based on High-resolution Electron Cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, 1989, **213**, 899-929.
- . **39 HEZAYEN F.F., REHM B.H., EBERHARDT R., STEINBUCHER A.** Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea : application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **54**(3), 319-25.
- . **40 KATES M.** : Biology of halophilic bacteria, part II. Membrane lipids of extreme halophiles : biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia*, 1993, **49**(12), 1027-1036.

- . **41 KIMURA Y.** Surface bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature*, 1997, **389**(6647), 206-211.
- . **42 KUO-CHEN C., CARLACCI L., MAGGIORA GERALD M., PIARODI L.A., SCHULZ M.W.** An energy-based approach to packing the 7-helix bundle of bacteriorhodopsin. *Protein science*, 1992, **1**, 810-827.
- . **43 LA BELLE R.L., GERBA C.P., GOYAL S.M., MELNICK J.L, CECH I., BODGAN G.F.** Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteritic viruses in estuaire sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, **39**(3), 588-596.
- . **44 LARKIN E.P., HUINT D.A.** : Bivalve mollusks : control of microbial contaminants. *Bioscience*, 1982, **32**(3), 193-197.
- . **45 LECLERC H., MOSSEL D.A.A.** *Microbiologie*. Le tube digestif, l'eau et les aliments. Paris : Doin, 1989, 134-137.
- . **46 LEDOUX M., FREMY J.M.** Phytoplankton, Phycotoxines et intoxications alimentaires. *Rec. Med. Vet.*, 1994, **170**, 129-139.
- . **47 LEISTNER L., RÖDEL W.** Inhibition of Micro-organisms in Food by Water Activity. In : SKINNER F.A., HUGO W.B., editors. *Inhibition and inactivation of vegetative Microbes*. New York : Academic Press, 1976, 219-237.
- . **48 LEISTNER L., RODEL W.** The Significance of Water Activity for Micro-organisms in Meats. In : DUCKWORTH RB, editors. *Water Relations of Foods*. London : Academic Press, 1975, 309-322.
- . **49 LIPP E.K., ROSE J.B.** Le rôle des poissons et des fruits de mer dans les toxoinfections alimentaires aux Etats-Unis d'Amérique. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1997, **16**(2), 620-640.
- . **50 LOAEC M., OLIER R., GUEZENNEC. J.** Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrates polymers*, 1998, **35**, 65-70.
- . **51 LOPEZ-GARCIA P., ABAD J.P., SMITH C., AMILS R.** Genomic organisation of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* : physical map of the chromosome. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20**, 2459-2464.
- . **52 MACKOWIAK P.A., CARAWAY C.T., PORNOY B.L.** Oyster-associated hepatitis : lessons from the Louisiana experience. *American Journal of Epidemiology*, 1976, **103**(2), 181-191.
- . **53 MADERN D., PFISTER C., ZACCAI G.** Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate deshydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur. J. Biochem.*, 1995, **230**, 1088-1095.

- . **54 MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J.** *Biology of Microorganisms*. 8th ed. : Prentice Hall, 1997.
- . **55 MONTALVO-RODRIGUEZ R.** : *Halogeometricum borinquense* gen. Nov., sp. Nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, 1305-1312.
- . **56 MOORE R.L., Mc CARTY B.J.** : Characterization of the desoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, 1969, **99**, 248-254.
- . **57 MOUNE S., MANAC'H N., HIRSCHLER A., CAUMETTE P., WILLISON J.C., MATHERON R.** *Haloanaerobacter salinarius* sp. Nov., a new halophilic fermentative bacterium that reduces Glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen on serine as electron donors ; emendation of the genus *Haloanaerobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (sous presse).
- . **58 NIEHAUS F., BERTOLDO C., KAHLER M., ANTRANIKIAN G.** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**(6), 711-729.
- . **59 OREN A.** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999, **63**(2), 334-348.
- . **60 OREN A., BRATBAK G., HELDAL M.** Occurrence of virus-like particule in the Dead Sea. *Extremophiles*, 1997, **1**(3), 143-149.
- . **61 PETERS J.B.** *Listeria monocytogenes* : a bacterium of increasing concern. Washington Sea Grant, *Seafood Processing Services*, 1989.
- . **62 PFEIFER F.** *Halophilic bacteria*, Vol. II. Boca Raton Florida : CRC Press Inc., 1988, 105-133.
- . **63 PITT J.I.** Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In : DUCKWORTH R.B., editors. *Water Relations of Foods*. London : Academic Press, 1975, 273-307.
- . **64 RAGUENES G., PIGNET P., GAUTHIER G., PERES A., CHRISTEN R., ROUGEAUX H., et al.** Description of a new polymer secreting bacterium from deep sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp *fijensis* and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**, 67-73.
- . **65 RAGUENES G., PERES A., RUIMY R., PIGNET P., CHRISTEN R., LOAEC M., et al.** *Alteromonas infernus*, sp. Nov., a new polysaccharid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Bacteriology*, 1997, **82**, 422-430.

- . **66 RAGUENES G., CHRISTEN R., GUEZENNEC J., PIGNET P., BARBIER G.** *Vibrio diabolicus* sp. Nov., a new polysaccharide secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal polychete anneling, *Alvinella pompejana*. *Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, **47**(4), 989-995.
- . **67 ROUGEAUX H., TALAGA P., CARLSON R.W., GUEZENNEC J.** Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp *fiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research*, 1998, **312**, 53-59.
- . **68 ROZIER J.** : *Comprendre et pratiquer l'hygiène en cuisine*. La Cuisine Collective, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 235 p.
- . **69 RUSSEL N.J.** Adaptative modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1989, **21**(1), 93-113.
- . **70 RUSSEL N.J., KOGUT M.** Haloadaptation : salt sensing and cell-envelope changes. *Microbiol. Sci.*, 1985, **2**(11), 345-350.
- . **71 SAINCLIVIER M.** Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines : salage, séchage, fumage, marinage, hydrolysats. In : *L'industrie alimentaire halieutique*. Vol. II., Rennes : Bulletin scientifique et technique de l'école nationale supérieure agronomique et du centre de recherches de Rennes, 1985, 6-162.
- . **72 STALEY J.T., BRYANT M.P., PFENNIG N., HOLT J.G., MURRAY R.G.E., BRENNER D.J. et al.** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. III. Baltimore : WILLIAMS & WILKINS, 1601-2298.
- . **73 VREELAND R.H., PISELLI A.F. Jr, Mc DONNOUGH S., MEYERS S.S.** Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles*, 1998, **2**(3), 321-31.
- . **74 WELSH D., LINDSAY Y.E., CAUMETTE P., HERBERT R.A., HANNAN J.** Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately sulfate reducing bacterium, *Desulfovibrio halophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, **140**, 203-207.
- . **75 WOESE C.R., MAGRUM L., FOX G.** Archeobacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 1978, **11**, 245-252.

LE SEL ET LES MICRO-ORGANISMES

LOZACH Erwan :

RESUME :

Le sel est un composé chimique naturel quasi inépuisable. Il reste actuellement employé comme agent de conservation dans l'industrie agro-alimentaire. Incorporé en quantité suffisante, il assure, via un abaissement de l'activité de l'eau, la stabilité microbiologique de certaines denrées alimentaires qu'il préserve ainsi de l'attaque microbienne. Certains micro-organismes sont néanmoins capables de supporter de fortes teneurs en sel ; ce sont les halotolérants (bactéries, levures,...) qui peuvent être à l'origine des phénomènes d'altération des aliments, voire de toxi-infections alimentaires. D'autres micro-organismes, dits halophiles, ne se développent qu'en présence de sel. Les Halobactéries, les plus halophiles des bactéries halophiles, sont qualifiées de bactéries extrêmes car elles occupent des niches écologiques où la salinité est bien plus élevée que dans les océans. Ces Halobactéries appartiennent à la famille des Archaeobactéries qui constituerait une ramification phylogénétique distincte de celle des Procaryotes et des Eucaryotes. L'halophilie chez ces bactéries consiste en un véritable pacte moléculaire avec le sel.

Mots-clés :

Sel – microorganismes – activité de l'eau – conservation – altérations – pathologies – Halobactéries.

JURY :

Président Pr

Directeur Pr CARLIER V.

Assesseur Pr BOULOUIS H.J.

M. LOZACH Erwan
Tromanoir
29420 PLOUENAN

SALT AND MICRO-ORGANISMS

LOZACH Erwan :

SUMMARY :

Salt is a natural chemical compound almost inexhaustible. It's still used today as a conserving agent in agro-alimentary industry. In enough quantity it keeps certain food products micrologically stable, and thanks to a decrease of water activity it preserves them from microbial attack. Some micro-organisms are able to support high salt concentration ; they are halotolerant (bacteria, yeast...). They can initiate food alteration, and even induce bacterial food poisoning. Some other micro-organisms, called halophilic, only grow in the presence of salt. Halobacteria, the most halophilic of the halophilic bacteria, are called extreme bacteria because they lived in ecological niches where salinity is far higher than in ocean. These Halobacteria belong to the Archaeobacteria family that should constitute a phylogeneticaly ramification distinct from Prokaryotes and Eukaryotes. Halophilism is, for these bacteria, a real molecular pact with salt.

Key words :

Salt – micro-organisms – water activity – alteration - feed conservation - pathology – Halobacteria.

JURY :

President :

Director : Pr. CARLIER V.

Assessor : Pr. BOULOUYS H.J.

M. LOZACH Erwan
Tromanoir
29420 PLOUENAN