

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Faculté: Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département: Biologie

Spécialité: Analyses Biologiques et Biochimiques

*Etude de l'effet de l'activité de l'eau et du pH sur l'inactivation
d'Escherichia coli*

Soutenu le : 21 juin 2017

Par

GOUASMI Ahlam

BENZERHOUDA Siham

Devant le

Jury

Présidente : Mme GUETARNI. H

MCB, UDB, Khemis Miliana

Promoteur: Mr AIT OUAZZOU.A

MCA, UDB, Khemis Miliana

Examinatrices :

M^{me} : SAADI.F

MAA, UDB, Khemis Miliana

M^{me} : MESTEFA SARI.F

MAA, UDB, Khemis Miliana

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements

Avant tout, nous remercions « Allah » le miséricordieux qui nous a donné courage et santé pour mener à terme notre projet de fin d'étude en souhaitant que nos efforts soient triomphés.

*Nous remercions vivement notre encadreur Mr **AIT OUAZZOU.A**, maître de conférence (A) à l'Université de Khemis Miliana pour sa disponibilité, ses conseils avisés, sa gentillesse, sa patience, sa confiance qu'il nous a accordé et la liberté d'action dont nous avons bénéficié tout au long de ce travail.*

Ainsi que :

*M^{me} **GUITARNI.H**, la présidente de jury ;*

*M^{me} **SAADI.F** et M^{me} **MESTAJA SARI.F**, les examinatrices ;*

Qui nous ont honorées de sacrifier une partie de leur temps pour examiner ce projet.

Nos remerciements sincères à tous nos enseignants qui nous ont guidées durant notre parcours scolaire du primaire à ce jour.

*Notre gratitude va également aux **D^r HOUTI Noureddine** et aux éléments de laboratoire du **D^r ZIBOUCHE Abdallah**.*

*On tient également à remercier les éléments du laboratoire universitaire de Khemis Miliana : Mr **Kamel**, M^{me} **Aïcha**, M^{me} **Naïma**, M^{me} **Affaf**, M^{me} **Wassila** et M^{me} **Nadjiba** ; pour leur sympathie et patience tout au long de notre stage pratique.*

On ne sera terminer sans remercier tous les collègues avec qui nous avons passé d'agréables moments pendant les cinq années de nos études, on les remercie tous pour leurs soutiens.

En terminant, on remercie toute personne qui nous a aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je commence ma dédicace au nom du Dieu et le salut sur Mohamed le messager de Dieu.

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,

A la mémoire de mon père,

Ce travail est dédié à mon père, décédé depuis 14 ans. J'aurais bien aimé ta présence le jour de ma soutenance de mémoire de Master, mais hélas, Dieu a voulu autrement. Que Dieu préserve ton âme.

A ma très chère mère,

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le *tout puissant*, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

A mes chers frères : Mohamed & Ahmed

J'espère atteindre le seuil de vos espérances. Que ce modeste travail soit l'expression de ma profonde affection. Je vous remercie pour le soutien moral et l'encouragement que vous m'avez accordés. Je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez.

A toute ma famille ainsi qu'à toutes mes amies : Sarah, Fatima, Nesrine, Nabila, Amani, Amal, Maram, Rbiha, Imane, Houda, Meriem et Fella.

*A ma chère partenaire dans ce Mémoire « **Benzerhouda Siham** » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail, et à toute sa famille.*

A tous les enseignants de l'U.K.M qui ont participé à ma formation durant mes cinq ans, sans les nommer, car la liste est longue et le risque est grand d'en oublier un.

*A toute ma promo de master ABB, avec lesquels j'ai passé 5 années inoubliables, Spécialement à : **Khaira & Maleq**, tout en leur souhaitant la réussite dans tout ce qu'ils entreprennent.*

*A mon encadreur, Mr **AIT OUAZZOU.A** pour ses conseils, son attention et sa patience.*

A tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin.

Ahlan

Dédicaces

À l'âme de mes frères **Fatima** et **Nasreddine**.

À la source de ma tendresse, ma perle, qui a consacré sa vie et m'a tenu de mes mains dans l'obscurité jusqu'à la lumière ... à ma chère **Maman**

À la source de ma fierté, mon appui, qui a consacré sa vie pour faire de moi ce que je suis ... à mon cher **Papa**

À mon deuxième père, mon exemplaire dans ma vie ... mon grand frère **Amar** et à son épouse **Dalila**

À ma fierté et mon orienteur, qui a fourni beaucoup d'efforts physiques et morales, et que je l'ai trop épuisé ... mon frère **Hicham**.

À mon inspirateur, avec sa gentillesse et son soutien moral. **MON** frère **Badreddine** et à son épouse **Naïma**.

À mon ami, plus que frère, qui a sacrifié son temps pour m'orienter. **MON** frère **Mourad** et à son épouse **Khadija**.

À ma deuxième mère, pour sa compréhension et ses conseils durant ma vie ... ma sœur **Ghania** et son époux **Omar**, et les anges **Zahia**, **Siffedine** et **Mohamed Louay**

À mon idole que je suis en train de suivre ses traces pour sa patience et son amitié ... ma sœur **Hafidha**

À toute la famille : **Benzerhouda** et **Sahel**

À celle qui a guidé mes premiers pas vers le savoir, et m'a donné mes premiers cours au primaire ... à **M^{me} Haouche Nadjet**

À ma chère amie du parcours, mon binôme **Gouasmi Ahlam** et sa famille.

À mes amis : **Maram**, **Fatima**, **Kheira**, **Imene**, **Amel**, **Leïla**, **Fella**, **Rebïha**, **Meryem**, **Houda** et **Abdelmalek**.

À tous mes chers collègues de dernière promo **ABB**.

Toutes mes considérations à mon encadreur **Mr AIT OUAZZOU Abdenour** pour son objectivité et sa lucidité.

Siham





Résumé

Résumé

Dans le but ultime de réduire les risques des bactéries pathogènes présentes dans les aliments, et de garantir la qualité des aliments et leur conservation, plusieurs travaux ont été concentrés sur l'étude de l'activité de l'eau. Dans ce contexte nous avons essayé d'étudier *in vitro* l'effet inhibiteur de l'activité de l'eau sur *E. coli* ATCC 25922. Un tampon McIlvaine à deux pH différents pH4.0 et pH 7.0 a été utilisé *in vitro* pour remplacer une matrice alimentaire, dont les activités de l'eau de ces milieux ont été modifiées dans cette gamme choisie (0,90-0,92-0,94-0,96) par l'ajout du sel (Na Cl). Ensuite ces milieux ont été inoculés avec l'agent pathogène (*E. coli*) et comme premier essai on les laisse à température ambiante puis on les soumit à un traitement thermique dans un bain marie à 60 °C. La réduction des cycles logarithmiques (\log_{10}) d'*E. coli* a été remarquée à température ambiante (1 cycle logarithmique) au fur et à mesure que le temps avance et que les a_w diminuent. Cette réduction est importante à température 60°C et le pH acide où elle atteint 5 cycles logarithmiques, des valeurs de D inférieures ont été enregistrées à pH acide par rapport le pH neutre. D'autre part on a noté qu'il y'a une légère résistance d'*E.coli* dans le tampon McIlvaine à pH7 qu'à pH4. Les résultats montrent que l'activité de l'eau exerce une activité inhibitrice (quand elle diminue) qui dépend de pH et de température du milieu de traitement.

Mots Clés : activité de l'eau, inactivation; *E. coli*; conservation; aliment; pH; température.

Abstract

With the ultimate goal of reducing the risks of pathogenic bacteria in foods, and ensuring food quality and preservation, several studies have focused on the study of water activity. In this context we have tried to study *in vitro* the inhibitory effect of water activity on *E. coli* ATCC 25922. A McIlvaine buffer at two different pHs pH4.0 and pH 7.0 was used to replace *in vitro* A food matrix of which the water activities of these media were modified in this chosen range (0.90-0.92-0.94-0.96) by the addition of the salt (NaCl). These media were then inoculated with the pathogen (*E. coli*) and, as the first test; they were left at room temperature and then subjected to a heat treatment in a water bath at 60°C. The reduction of logarithmic cycles (\log_{10}) of *E. coli* was observed at room temperature (1 logarithmic cycle) as time progressed and a_w decreased. This reduction is important at temperature 60°C and the acid pH where it reaches 5 logarithmic cycles, lower D values have been recorded at acidic pH relative to the neutral pH. On the other hand, it was noted that there is a slight resistance of *E. coli* in the McIlvaine buffer at pH7 and pH4. The results show that the activity of the water exerts an inhibitory activity (when it decreases) which depends on pH and temperature of the treatment medium.

Key words: water activity; inactivation; *E. coli*; preservation; food; pH; temperature.

ملخص

مع الهدف النهائي المتمثل في الحد من خطر البكتيريا المسببة للأمراض في الغذاء ، وضمان الجودة والحفاظ عليها، ركزت العديد من الدراسات على دراسة نشاط الماء. وفي هذا السياق حاولنا (دراسة في المختبر) التأثير المثبط لنشاط الماء على ايشيريشيا كولاي ATCC25922 ، تم استخدام محلول McIlvaine في درجتي حموضة pH4.0 و pH7.0 ليحل محل الغذاء في المختبر ، حيث تم تغيير الأنشطة المائية في هذه الوسائط في هذا النطاق المحدد (0.90-0.92-0.94-0.96) من خلال إضافة الملح (NaCl) ، ثم تم إضافة العنصر الممرض (ايشيريشيا كولاي) ، وكأول تجربة نتركهم في درجة حرارة الغرفة ، ثم نعرضهم لعلاج حراري في درجة حرارة 60 °م. لوحظ تخفيض الدورات اللوغاريتمية لايشيريشيا كولاي في درجة حرارة الغرفة (دورة واحدة) ، كما ومع مرور الوقت يتقدم هذا الانخفاض مع انخفاض أنشطة الماء. هذا الانخفاض كان كبيرا في درجة الحرارة 60 °م و وسط حامضي ، حيث يصل إلى 5 دورات لوغاريتمية ، وسجلت اقل قيم D في pH حامضي مقارنة مع درجة الحموضة المحايدة ، وعلاوة على ذلك فقد لوحظ أن هناك مقاومة طفيفة ل ايشيريشيا كولاي في محلول McIlvaine عند pH 7.0 أكثر من pH4.0. أظهرت النتائج أن نشاط الماء يمارس نشاط مثبط (عندما ينخفض) والتي تعتمد على درجة الحموضة ودرجة حرارة وسط العلاج .

الكلمات المفتاحية نشاط الماء ، تعطيل ، ايشيريشيا كولاي ، الغذاء ، الحفظ ، درجة الحموضة ، الحرارة .



Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et des acronymes

Introduction générale..... 1

I. Première partie: Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur Escherichia coli

I.1.1. Historique	5
I.1.2. Caractères généraux.....	5
I.1.3. L'espèce <i>Escherichia coli</i>	6
I.1.3.1. Caractères morphologiques	6
I.1.3.2. Caractères cultureux	7
I.1.3.3. Caractères biochimiques	8
I.1.3.4. Résistance aux agents physiques et chimiques	8
I.1.3.5. Substances élaborées	8
I.1.3.6. Caractères antigéniques.....	9
I.1.3.6.1. Antigène O, Antigène de la paroi ou Antigène somatique	9
I.1.3.6.2. Antigène K, Antigène Capsulaire Ou Antigène D'enveloppe.....	9
I.1.3.6.3. Antigène H ou antigène flagellaire	9
I.1.3.7. Pouvoir pathogène.....	10
I.1.3.8. Les différents pathovars d' <i>E.coli</i>	11
I.1.3.8.1. <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC)	11
I.1.3.8.2. <i>E. coli</i> entéro-toxinogènes (ETEC).....	11
I.1.3.8.3. <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	12
I.1.3.8.3.1. Les sources d' <i>Escherichia coli</i> O157:H7	12
I.1.3.8.4. <i>E. coli</i> entéro-aggrégatifs (EAaggEC).....	12
I.1.3.8.5. <i>E. coli</i> à adhérence diffuse (DAEC)	13
I.1.3.8.6. <i>E. coli</i> entéro-invasifs (EIEC).....	13
I.1.3.9. Les principaux facteurs de pathogénicité	13
I.1.3.9.1. Capsule.....	13
I.1.3.9.2. Adhésines.....	13
I.1.3.9.3. Toxines.....	13
I.1.3.9.3.1. Les entérotoxines cétotoniques.....	14
I.1.3.9.3.2. Les entérotoxines cytotoxiques	14

I.1.3.10. Moyens de lutte et traitements actuels	14
--	----

Chapitre 2: Les techniques de conservation des aliments

I.2.1. L'activité de l'eau	15
I.2.1.1. Action sur les microorganismes	17
I.2.1.2. L'humidité relative d'équilibre et l'activité de l'eau	19
I.2.1.3. La teneur en eau (w)	19
I.2.1.4. Activité de l'eau ou teneur en eau	20
I.2.1.5. Définition de l'isotherme de sorption	20
I.2.1.6. Isotherme et états de l'eau dans un aliment	21
I.2.1.6.1. L'eau fortement liée (eau retenue) : Pour $0 < a_w < 0.2-0.3$	21
I.2.1.6.2. Eau faiblement liée et eau libre Pour $a_w > 0.2-0.3$	22
I.2.1.7. Phénomène d'hystérésis	23
I.2.1.8. Intérêt des isothermes en technologie alimentaire	23
I.2.1.9. L'activité de l'eau, une mesure d'un grand intérêt pour les aliments	24
I.2.2. Le traitement thermique	28
I.2.2.1. Définition de traitement thermique	28
I.2.2.2. Mesure des traitements thermiques	29
I.2.2.2.1. La valeur- D	29
I.2.2.2.2. La valeur- Z	29
I.2.2.3. Effet de traitement thermique sur les microorganismes	29
I.2.2.4. Influence de la température sur la physiologie d' <i>E. coli</i>	29
I.2.3. Le pH	32
I.2.3.1. Le pH et les produits alimentaires	32
I.2.3.2. Le pH et le développement des micro-organismes	34

II. Deuxième partie: synthèse expérimentale

II.1. Cadre	37
II.2. Matériel biologique	37
II.2.1. Micro-organisme utilisé	37
II.2.2. Milieux de culture	37
II.3. Méthodes	37

II.3.1. Conservation de souche.....	37
II.3.2. Préparation de milieu de traitement (Tampon McIlvaine)	38
II.3.3. Préparation de l'eau physiologique	39
II.3.4. Stérilisation.....	39
II.3.5. Préparation de suspension bactérienne.....	39
II.3.5.1. Préparation de pré-culture et la culture de 24h	39
II.4. Etude de l'activité de l'eau	40
II.4.1. Effet de l'activité de l'eau sur <i>E. coli</i> à température ambiante	40
II.4.2. Effet de traitement thermique en combinaison avec l'activité de l'eau sur <i>E. coli</i> évaluée in « <i>in vitro</i> »	44
II.4.2.1. Protocole expérimental	44

III. Troisième partie: Résultats et discussion

III.1.1. Etude de l'activité de l'eau	50
III.1.1.1. Effet de l'activité de l'eau sur <i>E. coli</i> à température ambiante.....	50
III.1.1.2. Effet de traitement thermique en combinaison avec l'activité de l'eau sur <i>E. coli</i> évaluée in « <i>in vitro</i> »	53
III.1.1.3. Comparaison de traitement thermique combiné à a_w entre le tampon McIlvaine pH4.0 et pH7.0	57

IV. Conclusion générale 62

V. Références bibliographiques 63

VI. Annexes.....77

Liste des tableaux

Tableau I: Diminution de l'activité de l'eau par le NaCl (USFDA, <i>The Bad Bug Book</i> , 1997).....	15
Tableau II: Diminution de l'activité de l'eau par le Saccharose (Food Safety., 1997)	16
Tableau III: Activités de l'eau (a_w) requises pour soutenir la croissance des microorganismes représentatifs (Troller et al., 1984).....	18
Tableau IV: valeurs de l' a_w en fonction de diamètres des pores des aliments selon un modèle théorique (Etournaud., 1999)	22
Tableau V: Activité d'eau et croissance des micro-organismes dans les produits alimentaires selon FDA (Nsren., 2010)	25
Tableau VI : valeurs de ph de quelques produits alimentaires (Dupin et al., 1992).....	32
Tableau VII: Développement de quelques micro-organismes en fonction du pH (Dupin et al., 1992)	35
Tableau VIII: Diminution de l'activité de l'eau par le NaCl (USFDA, <i>The Bad Bug Book</i>).....	40
Tableau IX: Variation de temps d'inactivation décimale D d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans le tampon McIlvaine pH4 et pH7 à 60°C.....	55
Tableau X: Les valeurs z (°C) calculée pour la bactérie <i>E. coli</i> ATCC 25922 après un traitement thermique combiné à a_w dans un tampon de McIlvaine à pH4.0 et à pH7.0	59

Liste des figures

Figure 1: Morphologie d' <i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique. (Ducluzeau, 2006)	7
Figure 2: Pathogénie de la souche <i>E.coli</i> chez l'humain. Adapté de Nataro et Kaper, 1998; EcL, 2004).....	11
Figure 3: Isotherme d'adsorption et de désorption de l'eau (Charles et al., 2008).....	21
Figure 4: Schéma simplifié d'un pore des aliments (Etournaud., 1999).....	22
Figure 5: Procédure de mise en culture des souches.....	40
Figure 6: Schéma décrivant les étapes du protocole expérimental pour étudier l'effet de l' a_w sur l'inactivation d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 à température ambiante.....	44
Figure 7: Schéma décrivant les étapes du protocole de traitement thermique d' <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	48
Figure 8: Effet inhibiteur de différentes activités d'eau en fonction de temps vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH4 à température ambiante.....	50
Figure 9: Effet inhibiteur de différentes activités d'eau en fonction de temps vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH7 à température ambiante.....	51
Figure 10: Graphe récapitulatif représente l'effet inhibiteur de différentes activités d'eau en fonction de temps vis-à-vis d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH4 et pH7 à température ambiante.....	52
Figure 11 : Les courbes d'inactivation d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH4 à différentes activité d'eau en fonction de temps.....	54
Figure 12 : Les courbes d'inactivation d' <i>E.coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH7 à différentes activité d'eau en fonction de temps.....	56

Figure 13 : Graphe récapitulatif représente les courbes d'inactivation d'*E.coli* ATCC 25922 (10⁷ UFC/ml) inoculée dans McIlvaine pH4 et pH7 à différentes activité d'eau en fonction de temps **57**

Figure 14 : La courbe de temps de réduction décimale d'*E.coli* ATCC 25922 traité dans un tampon McIlvaine à pH4.0. **59**

Figure 15 : La courbe de temps de réduction décimale d'*E.coli* ATCC 25922 traité dans un tampon McIlvaine à pH7.0. **60**

Liste des abréviations et des acronymes

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

ATCC : American Type Culture Collection

AHI : Aliments à humidité intermédiaires

a_w : Activité de l'eau

°C : Degré Celsius.

D : Temps de réduction décimale

DAEC: *E. coli* à adhérence diffuse

E. coli : *Escherichia coli*.

EAggEC: *E. coli* entéro-aggrégatifs

EHEC : *E. coli* entéro-hémorragique

EIEC: *E. coli* entéro-invasifs

EPEC: *E. coli* entéro-pathogène

ETEC: *E. coli* entéro-toxinogènes

FDA: Food and Drug Administration

g : Gramme.

G.E.I : Gastro-entérites infantiles

H: Heure.

HR : Humidité relative

HRE : Humidité relative d'équilibre

ICMSF: International Commission on Microbial Specifications for Foods

Kg : kilogramme

L : Litre.

LT : Thermolabile.

M : Molarité

m : Masse

MC : McIlvaine.

Min : Minute

ml : Millilitre.

MS : Matière sèche

nm : Nanomètre

NaCl : Chlorure de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG : Orthonitrophényl- β -galactoside

pH : Potentiel Hydrogène.

P : la pression partielle de l'eau pure

P' : la pression partielle de vapeur d'eau d'une solution ou d'un aliment

ST: Thermostable.

St: Shiga-like toxine

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

TSA: Tryptone Soy Broth.

TSB: Tryptone Soy Agar.

Tr: Tour

UFC: Unité Formant Colonie.

USFDA: United States Food and Drug Administration

VP : Voges Proskauer

VT : Vérotoxines

W : La teneur en eau

YE : Extrait de levure

Z : L'accroissement de température nécessaire pour réduire le *D* à la dixième partie

μ l : Microlitre.

% : Pourcentage



Introduction générale

Introduction générale

Aucun produit alimentaire ne peut maintenir sa qualité originale et optimale indéfiniment. Pendant le stockage, il est inévitable, qu'une certaine détérioration se produise, qui rendra le produit inacceptable pour la consommation (**Blackburn, 2006**).

Il est cependant très difficile de concilier sécurité microbiologique et qualités organoleptiques, du fait de la grande variabilité existante, tant au niveau biologique (aliments crus, microorganismes différents), qu'au niveau pratique (temps de stockage, températures, vie des produits chez le consommateur...) (**Levy, 2010**).

L'évolution des industries agroalimentaires depuis une quarantaine d'années s'est faite par un fort développement de l'utilisation de produits alimentaires intermédiaires, en particulier les ingrédients secs (produits déshydratés, épices, céréales diverses...) dont la teneur en eau et l'activité de l'eau est réduite. Cette réduction de la quantité d'eau par séchage facilite ainsi leur transport, leur stockage ainsi que leur conservation à long terme, en préservant au mieux les propriétés organoleptiques et microbiologiques. Des bactéries pathogènes peuvent être retrouvées sporadiquement dans ces aliments du fait de l'utilisation de matières premières contaminées et de la contamination apportée par la transformation du produit ou de son stockage. L'efficacité des techniques utilisées pour maîtriser le risque microbiologique est profondément liée aux propriétés physico-chimiques du produit alimentaire, notamment l'activité de l'eau, ainsi qu'à la nature et à l'état physiologique de la flore pathogène présente (**Lang, 2016**).

Les Escherichia coli font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des hôtes communs de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des agents pathogènes importants émergents en santé publique. Ces bactéries sont à l'origine des épidémies de colites hémorragiques et de syndrome hémolytique et urémique (SHU). La grande majorité des cas est liée à la consommation d'aliments contaminés par un type particulier de STEC appelés *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Parmi lesquels on trouve le sérotype défini comme pathogène par l'AFSSA : O157. Il représente donc un danger pour la santé publique, avec un impact important pour les industries agro-alimentaires (**Savoie, 2011**).

Nous sommes tournés vers une alimentation qui allie qualités gustatives et nutritionnelles. De nombreuses techniques sont étudiées, visant dans l'idéal l'obtention d'un produit microbiologiquement maîtrisé, sans altération de saveur, se rapprochant le plus possible du produit original. Les techniques de décontamination sont très étudiées et présentent un intérêt central dans les industries agroalimentaires au niveau mondial. C'est pourquoi l'industrie alimentaire est sans cesse à la recherche de nouvelles techniques de conservation, visant à préserver la qualité des aliments, tout en optimisant au maximum la durée de conservation. (Levy, 2010).

En 1953, W.J.Scott a établi que l'activité de l'eau est la clé pour déterminer si les micro-organismes se développeront. (Aqualab, 2017).

A l'heure actuelle, les produits alimentaires à forte activité d'eau ou liquide sont pasteurisés ou stérilisés par l'intermédiaire de procédés thermiques. Ceux-ci sont composés d'une montée rapide à une température de consigne, maintenue pendant un temps défini garantissant l'inactivation des germes cibles.

La diversité actuelle des produits alimentaires et la diminution de l'intensité des traitements appliqués pour préserver leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles ont été accompagnées par le développement de modèles permettant de décrire plus précisément l'inactivation thermique des microorganismes. Parmi eux, certains prennent en compte d'autres facteurs que le temps et la température comme par exemple le pH (Lang, 2016).

La conservation des aliments est un combat constant contre les microorganismes d'altération ou les pathogènes de l'homme. (Levy, 2010).

Ce travail est axé sur :

- ✂ la contribution à la connaissance de l'une des méthodes de conservation des produits alimentaires, par l'étude de son effet sur l'inactivation d'une bactérie pathogène. Il s'agit de déterminer l'effet inhibiteur "*in vitro*" de l'activité de l'eau vis à vis d'*Escherichia coli*.
- ✂ la combinaison de ce processus de conservation avec d'autres technologies industrielles tel que le traitement thermique à 60°C et le potentiel hydrogène (pH) de milieu de traitement pour le rendre plus efficace sur l'inactivation d'*E. coli* afin :
 - d'éviter les changements dans les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments et surtout d'atteindre la sécurité sanitaire de ces produits.

- de minimiser les couts de traitement thermique et économiser en quelque sorte l'énergie.

Le travail présenté dans ce mémoire s'articule en deux parties:

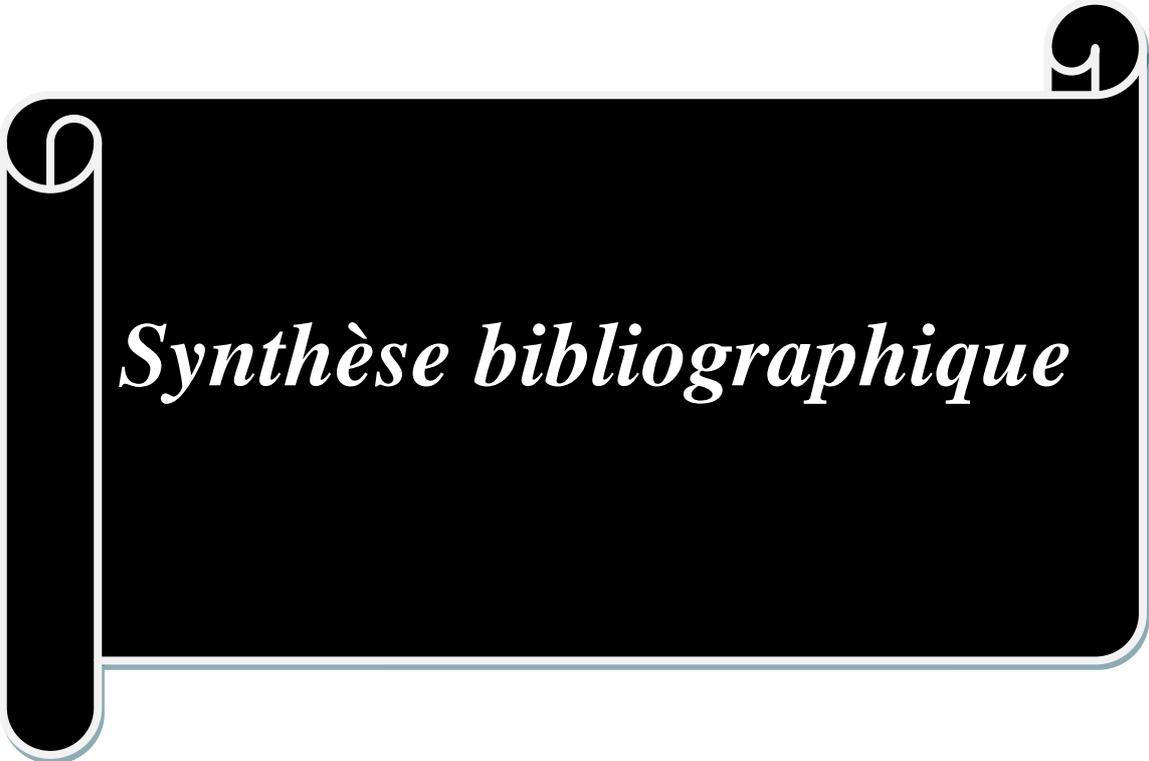
✧ Partie I: La synthèse bibliographique, où elle est subdivisée en trois chapitres:

- ✓ Chapitre I: Généralités sur *Escherichia coli*.
- ✓ Chapitre II: Généralités sur l'activité de l'eau.
- ✓ Chapitre III: Le traitement thermique.
- ✓ Chapitre IV: Le pH.

✧ Partie II : La synthèse expérimentale, où elle est subdivisée en deux chapitres:

- ✓ Chapitre I : Matériels et méthodes.
- ✓ Chapitre II : Résultats et discussion.

Enfin nous achèverons ce mémoire par une conclusion générale.



Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur *Escherichia coli*

I.1.1.Historique:

Théodor Escherichia, médecin Allemand fut en 1885 l'inventeur d'une bactérie particulière *Bacterium coli* commune qui sera appelée plus tard *Escherichia coli* (**Guiraud, 1998**). *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (**Avril et al., 1992**).

I.1.2.caractères généraux :

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, qui doit son nom à leur isolement fréquent du tube digestif et/ou des fèces des mammifères (**Greathorex et Thorne., 1994**). Les entérobactéries sont une vaste famille de bactéries qui sont rencontrées tous les jours en bactériologie médicale.

Le terme *Entérobactériaceae* vient de deux mots grecs: Enteron «intestin » et baktéron «petit bâton », il signifie bacille intestinaux (**Fauchère et al., 2002**).

La famille des Entérobactéries se définit par les caractères suivants (**Le Minor et al., 1990**):

- bacille à gram négatif (2 à 4 μ de long sur 0.4 à 0.6 μ de large) ;
- immobiles ou mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche;
- poussent sur milieu ordinaire;
- aérobies-anaérobies facultatifs;
- réduisent le nitrate en nitrite ;
- ont une réaction d'oxydase négative;

I.1.3.L'espèce *Escherichia coli*:

Selon le **Bergey's Manual of systematic bacteriology** l'espèce *Escherichia coli* appartient à l'ordre des *Enterobacteriales*; famille des *Enterobacteriaceae*; et au genre *Escherichia*. Elle est considérée comme un hôte normal de la microflore bactérienne du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de nombreux animaux à sang chaud (**Ghebru, 1988**).

Chez l'homme, on retrouve *E. coli* principalement dans le gros intestin (**Laskin et Lechevalier, 1994**).

E. coli est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10^7 à 10^9 corps bactériennes par gramme de selles (**Avril et al. 1992**).

A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (ex. *Salmonella thyphimurium*, *E. coli* O157:H7...). En outre, bien que la majorité des souches de *E. coli* soient commensales banales, certaines d'entre elles sont pathogènes et connues des médecins comme étant à l'origine de pathologies intestinales (**Levine, 1987**) ou extra-intestinales (**Pohl, 1993**).

I.1.3.1.Caractères morphologiques:

Bacille à bout arrondi, Gram-, mesure approximativement 2 à 4 μ de longueur sur 0.6 μ de largeur, ne possédant ni capsule ni spores, elle se présente isolé ou en courtes chaînettes (**Figure 1**), et en quelque cas, sous forme de très long filaments (**Djelouat, 2008**).

Pourvu de cils, elle est généralement mobile grâce à une ciliature péritriche mais cette mobilité est très variable selon le milieu où la souche a étéensemencée.

Certaines souches développent des capsules et cultivent sur milieux solides en donnant des colonies muqueuses (**Le Minor et Richard, 1993**).

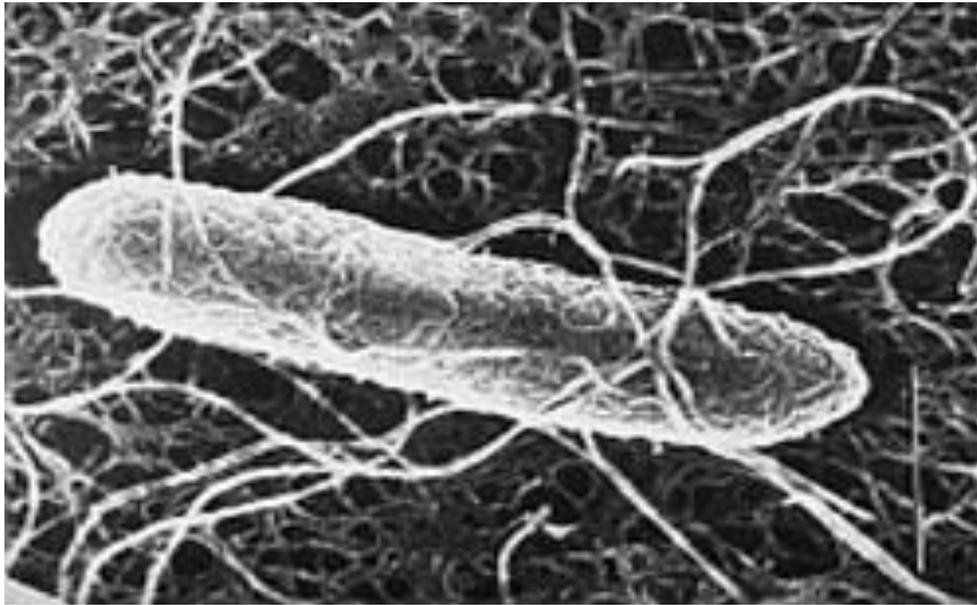


Figure 1: Morphologie d'*Escherichia coli* sous microscope électronique. **Ducluzeau, (2006).**

I.1.3.2. Caractères cultureux:

Elle cultive bien en 24 heures à 37 °C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes; lisses, à bords régulier, de 2 à 3 mm de diamètre. (**Marchal et al., 1991**).

La culture en bouillon ordinaire, rapide, produit un trouble avec ondes et parfois un voile grisâtre en surface (**Pasteur, 1981; Marchal et al., 1991**).

Sur gélose ordinaire, la bactérie donne une culture blanchâtre, épaisse crémeuse, devenant rapidement opaque, et envahissant toute la surface du milieu, et sur milieu gélosé Mac Conkey les colonies sont lactose positif et donnent une coloration rouge brique (**Pasteur., 1981 ; Marchal et al., 1991**).

Toutes ces cultures répandent, en générale, une odeur fécaloïde. (**Pilet et al., 1981**).

I.1.3.3. Caractères biochimiques:

Toute Entérobactérie lactose positif, indole positif oriente vers une *Escherichia coli*. (Larpent, 1997). Selon Guechi, (2002) environ 70 % des souches mobiles donnent les caractères suivants:

- Gaz en glucose positifs en général ;
- Production d'indole positif ;
- Lactose, mannitol, sorbitol positif ;
- β -galactosidase (ONPG) positive ;
- Phénylalanine-désaminase, uréase, oxydase, H₂S, négatifs ;
- Rouge de méthyle positif,
- Vogues Proskauer (VP) négative.

I.1.3.4. Résistance aux agents physiques et chimiques :

Escherichia coli est relativement sensible aux agents physiques et chimiques, dans la majorité des cas, une température de 55°C pendant une heure ou 60°C pendant 20 mn est mortelle pour ces organismes et ils sont tués en autoclave à 120°C pendant 20 mn. (Mao et al., 2003).

Elle peut survivre des semaines ou des mois dans l'eau, les matières fécales et dans les poussières des animaux domestiques, elle est hautement sensible à l'action létale du phénol et du crésol, mais l'efficacité de ces désinfectants est réduite en présence du mucus et des fèces (Guechi, 2002).

I.1.3.5. substances élaborées:

Les colibacilles peuvent produire:

- Des entérotoxines: certaines souches d'*E.coli* produisent l'une des deux entérotoxines qui l'on appelle TL (Thermolabile) et VT (vérotoxines) ou les deux à la fois;
- Des hémolysines;
- Des enzymes capables de détruire certains antibiotiques. Exemple: β -lactamase;

-Des bactériocines, substances à action antibiotique qui détruisent spécifiquement d'autre bactérie, elles sont dénommées colicines (Eberlin., 1997).

I.1.3.6. Caractères antigéniques :

I.1.3.6.1. Antigène O, Antigène de la paroi ou Antigène somatique:

Cet antigène est localisé au niveau de la paroi bactérienne de nature lipopolysaccharidique. Il existe environ 180 antigènes O différents (Fauchère et al., 2002).

Chaque antigène O permet de définir un sérotype O correspondant, grâce à des réactions d'agglutination. (Pilet et al., 1981).

I.1.3.6.2. Antigène K, Antigène Capsulaire Ou Antigène D'enveloppe :

De nature polysaccharidique, ils entourent les antigènes O et se présente sous deux types de structure:

-la première, capsulaire lorsqu'ils constituent une capsule visible au microscope;

-et la seconde, d'enveloppe quand ils ne sont pas visibles au microscope et masquent les antigènes somatiques.

Environ 80 antigènes K ou antigène d'enveloppes différentes ont été reconnus (Joly et Alain., 2003).

I.1.3.6.3. Antigène H ou antigène flagellaire:

Ils sont présents dans les flagelles sous forme de flagelline, protéine fibreuse comparable à la myosine du muscle. Les antigènes ne sont présents que chez les souches mobiles (Joly et Alain., 2003), donc pourvues de flagelle (Kauffman, 1947).

On en connaît 56 types (Joly et Alain., 2003).

Les antigènes O, K, H sont à la base d'un schéma de diagnostic antigénique, notamment pour le diagnostic différentiel, ils permettent d'établir le sérotype et de détecter les souches d'*Escherichia coli* responsables de pathologies (Kauffman, 1947).

I.1.3.7. Pouvoir pathogène :

La propagation de l'infection à l'homme peut s'effectuer directement par contact de personne à personne par la route oro-fécale, indirectement par la consommation d'aliments ou d'eau contaminés. De nombreux cas d'infection à *E. coli* ont été associés avec la consommation de bœuf haché insuffisamment cuit, de lait cru, de fruits et légumes ou d'eau contaminée avec des matières fécales (**LeBlanc., 2003**).

Les symptômes associés aux infections par *E. coli* sont notamment des crampes abdominales et des diarrhées susceptibles d'évoluer vers des diarrhées sanguinolentes (**Karch et al., 2005**). De la fièvre et des vomissements peuvent également être observés (**LeBlanc., 2003**). La période d'incubation va de 3 à 8 jours avec une durée médiane de 3 à 4 jours (**OMS., 2016**).

Dans la plupart des cas, la guérison s'effectue dans les 10 jours, mais chez un nombre restreint de patients, l'infection peut parfois se compliquer par un syndrome urémique hémolytique qui affecte les reins (**LeBlanc., 2003**).

E. coli possède des facteurs de virulence lui permettant de s'attacher aux cellules intestinales et de libérer des toxines, connues sous le nom de vérotoxines ou toxines de type Shiga en raison de leur ressemblance avec les toxines élaborées par *Shigella dysenteriae* (**Figure 2**). Les vérotoxines jouent un rôle important dans l'apparition des symptômes gastro-intestinaux mais l'étape cruciale dans la pathogenèse d'*E.coli* est l'attachement aux cellules de l'hôte (**LeBlanc., 2003**).

Le diagnostic chez l'humain s'effectue soit par l'isolation de la bactérie *E. coli* ou la détection de la présence des vérotoxines dans des échantillons fécaux ou la détection d'une augmentation d'anticorps anti- *E. coli* dans le sérum (**Nataro et Kaper., 1998**).

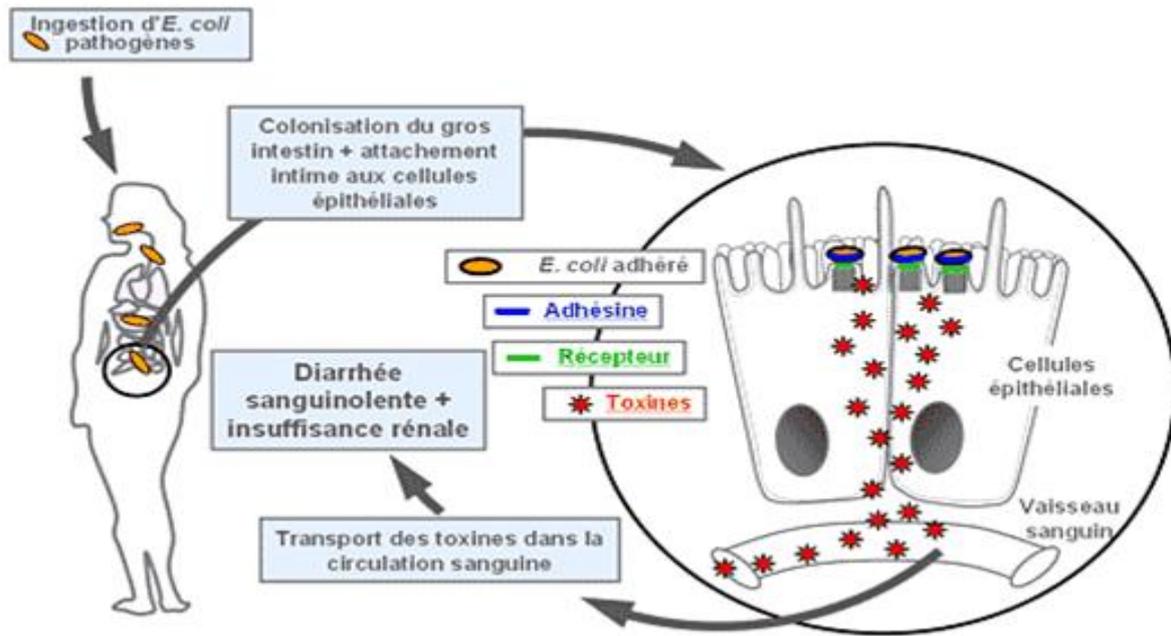


Figure 2 : Pathogénie de la souche *E. coli* chez l'humain. Adapté de Nataro et Kaper (1998); EcL (2004).

I.1.3.8. Les différents pathovars d'*E. coli*:

I.1.3.8.1. *E. coli* entéropathogène (EPEC):

Ces souches étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités.

Ces souches encore appelées *E. coli* G.E.I (des gastro-entérites infantiles) sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles sont alors isolées de cas sporadiques. (Andrade et al., 1989; Jerse et al., 1990).

I.1.3.8.2. *E. coli* entéro-toxinogènes (ETEC):

Leur pouvoir pathogène est dû principalement à la sécrétion de toxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT) (Kaper et al., 2004). Elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent aussi chez les voyageurs «Turista». Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays (Levine., 1987).

I.1.3.8.3. *E.coli* entérohémorragiques (EHEC):

Ces souches ont été décrites en Amérique du Nord, au Japon et en Europe. Elles sont responsables d'épidémies de diarrhées aqueuses puis hémorragiques (colite hémorragique). Elles appartiennent à quelques sérotypes particuliers (O157 :H7, mais aussi O103:H2, O26:H11, O111:H38). Les EHEC sont capables de produire une ou plusieurs cytotoxines appelées verotoxines capables de tuer in vitro les cellules Vero (cellules rénales du singe vert africain) par inhibition de la synthèse protéique. Les toxines sont appelées également Shiga-Like-Toxin en raison de leurs similitudes avec la toxine de *Shigella dysenteriae* type 1. (Karmali., 1989).

I.1.3.8.3.1. Les sources d'*Escherichia coli* O157:H7:

Ce n'est qu'à partir de 1982 après que deux épidémies de colites hémorragiques dues à une infection à *E. coli* O157:H7 aux Etats Unis dues à la consommation de hamburger qu'ont commencé à s'intéresser aux *E. coli* O157:H7 (Riley et al., 1983).

Les sources de *E.coli*O157: H7 sont avant tout les produits d'origine animale avec en premier lieu les steaks hachés de bœufs insuffisamment cuit (Chapman et al.,1993; Willshaw et al., 1993; Rodrigue et al., 1995; Cowden, 2001), les produits laitiers (les fromages au lait cru) (Morgan et al., 1993; Allerberger et al., 2001), les ovo-produits, mais également les produits d'origine végétale (cidre artisanal de pommes, laitues, pomme de terre, pousse de radis...) (Morgan et al., 1988; Hilborn et al., 1999; Michino et al., 1999; Breuer et al., 2001).

D'autres parts, le milieu extérieur représente une source importante, notamment par l'intermédiaire de l'eau (baignades en lac ou en pataugeoires contaminées par des matières fécales d'origine humaine, ou eau de boisson insuffisamment chlorées...).(Keene et al., 1994; Jackson et al., 1998; Paunio et al., 1999; CDC, 2000).

I.1.3.8.4. *E.coli* entéro-aggrégatifs (EAaggEC):

Les EAEC sont une catégorie de souches pathogènes associés, à des diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers des formes persistantes (Huang et al., 2006). Ils élaborent une entérotoxine thermostable (EASTI) et une entérotoxine thermolabile (Kaper et al., 2004).

I.1.3.8.5. *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC):

Les DAEC sont une toute nouvelle catégorie de souches associées à des diarrhées aqueuses aiguës ou persistantes survenant surtout chez les enfants (plus particulièrement ceux âgés de 2 à 6 ans) (Garcia et al., 1996).

I.1.3.8.6. *E. coli* entéro-invasifs (EIEC):

Les EIEC sont responsables de diarrhées aqueuses qui, dans de rares cas, vont évoluer vers une dysenterie suggérant que leur pouvoir pathogène est similaire à celui des *Shigella sp.* (Nataro et Kaper., 1998). Elles sécrètent la même vérotoxine, elles sont retrouvées surtout chez les enfants de moins de dix ans dans les pays en voie de développement (Leclerc et al., 1995).

I.1.3.9. Les principaux facteurs de pathogénicité:

I.1.3.9.1. Capsule:

Elle est de nature polysaccharidique. On en connaît 80 variétés immunologiques différentes (antigène K) .La capsule rend la phagocytose plus difficile. Ce sont les *E. coli* de type K1 qui sont responsables de la majorité des infections néo-natales (Nauciel., 2000).

I.1.3.9.2. Adhésines:

De multiples adhésines ont été décrites. Elle peuvent induire une adhésion à des globules rouges ou à des cellules épithéliales en culture .La plupart des adhésines se présentent sous forme de fimbriae (Nauciel., 2000).

I.1.3.9.3. Toxines:

Les entérotoxines bactériennes protéiques sont généralement classées selon leurs caractéristiques biochimiques et structurales d'une part et, d'autre part, selon leurs modes d'action ou leurs types d'activités biologiques (Rousset et Dubreuil., 2000).

I.1.3.9.3.1. Les entérotoxines cétotoniques:

Affectant les cellules épithéliées intestinales pour en altérer les fonctions sécrétoires. Les entérotoxines produites par les *Escherichia coli* enterotoxinogènes (ETEC) provoquent ce type de diarrhée non-inflammatoire rapide et déshydratante (**Rousset et Dubreuil., 2000**).

I.1.3.9.3.2. Les entérotoxines cytotoxique:

Agissant sur l'épithélium intestinal en y provoquant des dommages histologiques importants. Les représentants des entérotoxines cytotoxiques les plus connus sont les vérotoxines VT1, VT2 (ou toxine « Shiga-like », Stx1 et Stx2) des *E. coli*. (**Rousset et Dubreuil., 2000**).

I.1.3.10. Moyens de lutte et traitements actuels:

La prévention de l'infection à *E. coli* exige des mesures de lutte à toutes les étapes de la chaîne alimentaire, depuis la production jusqu'au traitement, à la fabrication et à la préparation des aliments, tant dans les établissements commerciaux que dans l'environnement domestique. Ainsi, les mesures d'hygiène accrues et la cuisson des aliments demeurent des moyens efficaces pour diminuer l'incidence de ces infections.

Actuellement, l'antibiothérapie est le traitement le plus commun contre les infections à *E. coli*. Cependant, des études cliniques récentes ont montré que leur utilisation ne serait pas recommandée car ils peuvent être associés à un risque plus élevé de développer un syndrome urémique hémolytique chez les enfants et les personnes âgées en plus d'allonger la durée de la diarrhée (**Molbak et al., 2002; Panos et al., 2006**).

Ces auteurs ont entre autres attribué cet effet d'allongement de la diarrhée à l'élimination du micro biote intestinal compétiteur laissant place à la multiplication des *E. coli* et plus particulièrement si les souches sont résistantes aux antibiotiques administrés. De plus, en lysant les cellules les antibiotiques peuvent augmenter la diffusion des toxines (**Nataro et Kaper., 1998**).

Chapitre 2: Les techniques de conservation des aliments

I.2.1.L'activité de l'eau (a_w) :

L'eau est essentielle à la survie et au développement de tous les microorganismes. Dans les aliments, une partie est dite « libre » c'est-à-dire qu'elle est disponible pour les microorganismes. L'autre partie est liée aux constituants des aliments et ne peut être utilisée (Vallerian., 1999).

L'activité de l'eau (a_w) représente l'eau disponible (eau libre) pour la réalisation des réactions métaboliques, en particulier pour les réactions enzymatiques. (Branger et al., 2007).

L'activité de l'eau est définie comme le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'une solution ou d'un aliment (P') sur la pression partielle de l'eau pure (P) à la même température :

$$a_w = \frac{P'}{P} \text{ (Branger et al., 2007).}$$

Elle peut être abaissée en éliminant l'eau libre par évaporation et séchage (Jeantet et al., 2006), ou par apport de solutés très hydrophiles qui fixent des molécules d'eau par interactions hydrogènes ou dipolaires (salage, sucrage) (Schuck et al., 2012).(tableau I et tableau II). Les valeurs de l' a_w sont comprises entre 0 et 1, la valeur de l' $a_w=1$ étant réservée à l'eau pure (Branger et al., 2007).

Tableau I : Diminution de l'activité de l'eau par le NaCl (USFDA, The Bad Bug Book, 1997).

Na Cl (g)	Eau (g)	Na Cl %	Activité de l'eau (a_w)
0.9	99.1	0.9	0.995
1.7	98.3	1.7	0.99
3.5	96.5	3.5	0.98
7.0	93.0	7.0	0.96
10.0	90.0	10.0	0.94
13.0	87.0	13.0	0.92
16.0	84.0	16.0	0.90
22.0	78.0	22.0	0.86

Tableau II : Diminution de l'activité de l'eau par le Saccharose (**Food Safety., 1997**).

Saccharose (g)	Eau (g)	Saccharose %	Activité de l'eau (a_w)
0	100	0	1.00
20	100	16.7	0.998
40	100	28.6	0.969
60	100	37.5	0.955
80	100	44.4	0.941
100	100	50.0	0.927
120	100	54.5	0.913
140	100	58.3	0.900
160	100	61.5	0.888
180	100	64.3	0.876
200	100	66.7	0.860

Selon la formule: $a_w = \frac{1,00}{1+0,27n}$

Où :

n: est le nombre de moles de sucre par 100 g d'eau.

Un mole de saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) = 342 grammes (**Food Safety., 1997**).

La congélation entraîne également une diminution de l'activité de l'eau dans la mesure où l'eau libre est piégée sous forme de glace (**Branger et al., 2007**).

La déshydratation des produits alimentaires permet d'en assurer une bonne stabilité par abaissement de l'activité de l'eau et permet de réduire les coûts de transport et stockage (**Bimbenet et Loncin., 1995**). En se dissolvant dans l'eau contenue dans les aliments, le sel diminue l'eau disponible et stoppe ainsi la croissance des microorganismes (**Nganguem., 2007**).

Par rapport aux traitements thermiques, la conservation par inhibition en abaissant l'eau disponible a l'avantage de moins altérer la qualité nutritionnelle et organoleptique. De plus l'inhibition générée par abaissement d' a_w peut être levée par réhydratation, décongélation et dilution (**Nganguem., 2007**).

La détermination de l'activité de l'eau permet de faire la distinction entre eau libre et eau liée et d'en déduire notamment les propriétés de conservation de la denrée (**Etournaud., 1999**). L'eau disponible ou eau libre (symbolisée en science alimentaire par l'activité de l'eau) joue un rôle déterminant dans la conservation des aliments. Elle a double rôle : celui de solvant et de réactif (**Jeantet et al., 2006**).

- ♣ en tant que solvant, elle assure le transfert des substrats, des facteurs de croissance, des agents biologiques et des produits de réaction ce qui permet le déroulement des réactions dans des conditions optimales ;
- ♣ en tant que substrat de réaction, elle intervient dans les réactions d'hydrolyse (protéolyse, lipolyse) (**Schuck et al., 2012**).

En effet, en abaissant cette eau, on améliore la stabilisation du produit et les réactions d'hydrolyse (**Jeantet et al., 2006**).

I.2.1.1. Action sur les microorganismes:

Dans les cellules microbiennes, l'eau joue le rôle du solvant des substances nécessaires à la vie cellulaire (sels minéraux, substances organiques, gaz), elle permet l'ionisation des substances dissoutes, elle sert de transporteur de différentes substances chimiques, elle participe à la polarisation des membranes et maintient la turgescence de la cellule ,elle participe à de nombreuses réactions enzymatiques (hydrolyse, oxydoréduction) et assure l'hydratation et donc l'activité des macromolécules (protéines, acides nucléiques).

Lorsque l'activité de l'eau est trop proche de 1, les microorganismes ont du mal à se développer car ils peuvent dépenser une énergie importante pour expulser l'eau des cellules .Une activité de l'eau faible entraîne une déshydratation intracellulaire et une perturbation importante du métabolisme qui va jusqu'à s'arrêter. Les valeurs d'activité de l'eau incompatibles avec la croissance entraînent progressivement une destruction des populations microbiennes (**Branger et al., 2007**).

Les bactéries Gram négatives, y compris les espèces de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella* ne proliféreront ou ne survivront pas dans des produits conservés avec des activités d'eau inférieures à 0,91, tandis que les bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* ne proliféreront pas en dessous de 0,86 et *Aspergillus Niger* ne proliférera pas en dessous de 0,77. De plus, même les levures osmophiles et les champignons xérophiles ne prolifèrent pas en dessous de 0,60.

Les exigences d'activité de l'eau mesurées à 25 °C pour la croissance d'une gamme de microorganismes représentatifs sont présentées dans le **tableau III (Troller et al., 1984)**.

Tableau III : Activités de l'eau (a_w) requises pour soutenir la croissance des microorganismes représentatifs (**Troller et al., 1984**).

Les bactéries	Activité de l'eau (A_w)	Les moisissures et les levures	Activité de l'eau (A_w)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97	<i>nigricans Rhizopus</i>	0,93
<i>Bacillus cereus</i>	0,95	<i>Mucor plumbeus</i>	0,92
<i>Clostridium botulinum</i> , type A	0,95	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,92
<i>Escherichia coli</i>	0,95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0,95	<i>Paecilomyces variotti</i>	0,84
<i>Lactobacillus viridescens</i>	0,95	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,83
<i>Salmonella</i> spp.	0,95	<i>aspergillus fumigates</i>	0,82
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,94	<i>Penicillium glabrum</i>	0,81
<i>Bacillus subtilis</i>	0,90	<i>aspergillus flavus</i>	0,78
<i>Micrococcus lysodekticus</i>	0,93	<i>Aspergillus Niger</i>	0,77
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	<i>Zygosachharomyces rouxii</i> (levure osmophile)	0,62
<i>Halobacterium halobium</i>	0,75	<i>Xeromyces bisporus</i> (champignons xérophiles)	0,61

Nous disposons actuellement que de très peu d'informations concernant l'effet de l'activité de l'eau sur la croissance des STEC, les études ont essentiellement porté sur des milieux et des produits dont l' a_w était contrôlée par l'ajout de NaCl. L'activité de l'eau minimale pour la croissance d'*E. coli* O157 :H7 est de 0.953 (**Nauta et Dufrenne., 1999**). L' a_w optimum pour la croissance est de 0.995 selon les données de l'**ICMSF (1996)**.

I.2.1.2.L'humidité relative d'équilibre et l'activité de l'eau :

La notion de disponibilité de l'eau dans un aliment peut être définie aux moyens de:

- ♣ l'humidité relative d'équilibre :

$$\text{HRE} = \frac{\text{Pression partielle de la vapeur d'eau de l'aliment à la température } \theta}{\text{Pression partielle de la vapeur d'eau saturante à la température } \theta} \times 100$$

$$\text{HRE} = \frac{P_w}{P_{w^\circ}} \times 100 \quad (1) \quad (\text{Pascal., 2015}).$$

L'humidité relative d'équilibre est indiquée sur une échelle de 0 à 100 % HR (**Rotronic., 2013**).

- ♣ L'activité de l'eau :

$$a_w = \frac{P_w}{P_{w^\circ}} = \frac{\text{HRE}}{100} \quad (2) \quad (\text{Pascal., 2015}).$$

I.2.1.3. La teneur en eau (w):

La teneur en eau d'un matériau est le rapport de la masse d'eau contenue dans ce matériau à la masse du même matériau sec (**Nguyen., 2015**).

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_2}$$

où:

m_1 : Masse du matériau humide (Kg)

m_2 : Masse du matériau sec (Kg)

La teneur en eau est déterminée par séchage à l'étuve pendant 24 h à 105 °C (**AOAC, 1990**). Elle est exprimée en pourcentage de poids (% pds). Cette unité est répandue dans de nombreux secteurs industriels (**Rotronic, 2013**).

I.2.1.4. Activité de l'eau ou teneur en eau

Une incertitude persiste souvent sur le fait de savoir s'il faut mesurer l'activité de l'eau ou la teneur en eau.

Dans de nombreuses branches de l'industrie, la teneur en eau est utilisée pour des raisons quantitatives, afin de contrôler la quantité d'eau contenue par un produit.

Le contrôle de la teneur en eau peut être utile pour s'assurer de sa qualité mais peut également être un facteur de rentabilité lorsque, par exemple, un produit est vendu au poids (plus d'eau signifie alors plus de gain).

L'activité de l'eau joue au contraire un rôle plus important pour des raisons qualitatives, comme la stabilité des produits, leur capacité de stockage (p.ex. la stabilité microbiologique et enzymatique, conservation de l'arôme), les propriétés de manipulation (p.ex. formation de grumeaux dans les poudres), la stabilité chimique (p.ex. pour des médicaments) (**Rotronic., 2013**).

La relation entre la teneur en eau d'un aliment et l'activité de l'eau, à une température constante est représentée par les isothermes de sorption. Étant donné que la technique la plus utilisée pour préserver la qualité des aliments est la réduction de l'activité de l'eau jusqu'aux niveaux suffisamment bas, l'obtention de l'isotherme de sorption est essentielle pour déterminer le niveau d'humidité à partir duquel on inhibe la croissance microbienne et la production de mycotoxines pendant la conservation (**Gonzalo et al., 2011**).

I.2.1.5. Définition de l'isotherme de sorption :

C'est la courbe qui indique à l'équilibre et pour une température déterminée: La quantité d'eau retenue par un aliment donnée (**Nafti., 2011**).

Cette courbe représentant, pour une température θ donnée, la teneur en eau d'un produit en fonction de la valeur de a_w ou de l'HRE est appelée:

- ♣ **Isotherme d'adsorption**, si elle a été déterminée expérimentalement en partant d'un produit sec.
- ♣ **Isotherme de désorption**, si elle a été déterminée expérimentalement en partant d'un produit saturé en eau.

On peut représenter graphiquement la courbe appelée isotherme d'adsorption-désorption, obtenue en portant :

- ♣ En abscisse : soit l' a_w , soit l'HRE
- ♣ En ordonnée : la teneur en eau du produit exprimée en g d'eau pour 100 g de matière sèche (% MS) (Pascal, 2015)

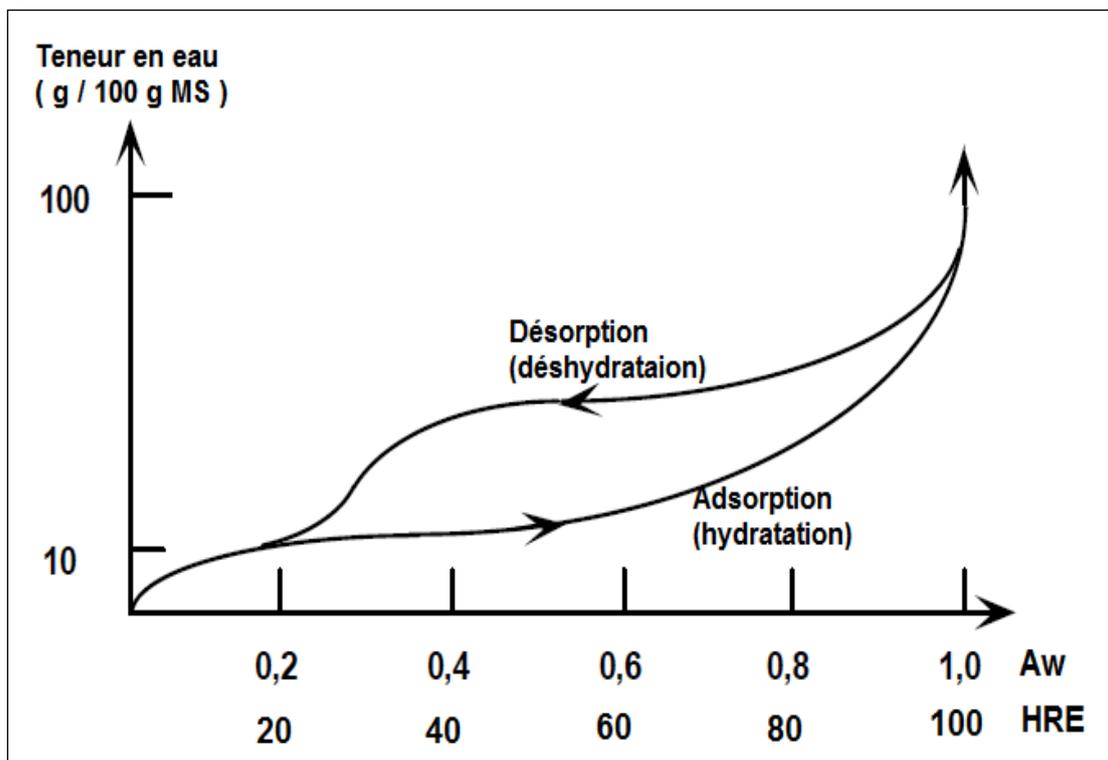


Figure 3: Isotherme d'adsorption et de désorption de l'eau (Charles et al., 2008).

I.2.1.6. Isotherme et états de l'eau dans un aliment:

I.2.1.6.1. L'eau fortement liée (eau retenue): pour $0 < a_w < 0.2-0.3$

Une couche monomoléculaire d'eau fixée sur des groupes polaires: $-NH_3^+$ et $-COO^-$ de protéines, $-OH$ de glucides, eau de cristallisation des sels et des glucides (Nafti., 2011) par des liaisons hydrogènes H (Etournaud., 1999).

Cette eau représente 3 à 10g/100g de poids sec. L'eau de cette couche est difficile à enlever, n'est pas congelable, non disponible ni étant que solvant, ni étant que réactif (Nafti, 2011).

I.2.1.6.2. Eau faiblement liée et eau libre (Charles et al., 2008) Pour $a_w > 0.2-0.3$ (Nafti., 2011):

Il s'agit des couches successives d'eau fixées sur la première couche par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, à cette eau on peut ajouter un vapeur d'eau condensée dans les pores des aliments (Nafti., 2011) (a_w diminue d'autant plus que le diamètre est faible Charles et al., 2008). (Tableau IV)

Tableau IV: valeurs de l' a_w en fonction de diamètres des pores des aliments selon un modèle théorique (Etournaud., 1999).

Diamètre ϕ (nm)	Activité de l'eau (a_w)
1000	env. 1,00
10	0,90
01	0,34

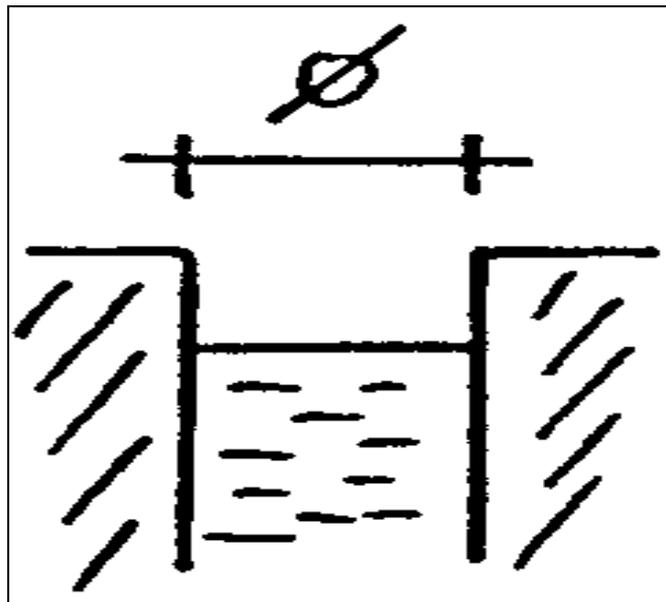


Figure 4: schéma simplifié d'un pore des aliments (Etournaud., 1999).

Elle est congelable (Etournaud., 1999) et disponible tant comme solvant que comme réactif, pour ces raisons on considère qu'il n'y a pas une différence fondamentale entre l'eau faiblement liée et l'eau libre dont l'activité est proche de celle de l'eau pure, cependant, cette eau libre ne sort pas spontanément des tissus animaux ou végétaux.

Elle se trouve en très grande partie sous forme de gel, tant à l'intérieur de cellules que dans les espaces inter cellulaires (Nafti., 2011).

I.2.1.7. Phénomène d'hystérésis:

Les deux courbes sont en général différentes (**Figure 3**) car le séchage d'un produit (passage d' $a_w = 1$ à $a_w < 0,6$) (Pascal., 2015) (désorption) ou l'humidification (adsorption) (Nguyen., 2014) entraîne des modifications de structure et de porosité irréversibles (Pascal., 2015).

On remarque sur (**la figure 3**) précédente que l'isotherme de désorption pour un produit donné et pour une température déterminée n'est pas superposable à l'isotherme d'adsorption. Cette non coïncidence est appelée Hystérésis, ce phénomène n'observe que pour des activités d'eau supérieure à 0.2-0.3 c'est-à-dire au l'eau ne serait que faiblement liée (Nafti., 2011).

Ce phénomène par le fait que le diamètre des pores (Nafti, 2011) des aliments sont en général plus petits en surface qu'en profondeur. La pression de vapeur d'eau nécessaire au remplissage est plus élevée que celle à laquelle les pores se vident (Pascal., 2015).

I.2.1.8. Intérêt des isothermes en technologie alimentaire:

- ♣ Prévoir l'activité de l'eau de mélange de divers ingrédients plus ou moins humides ;
- ♣ Prévoir le comportement d'un aliment lors d'un traitement ou entreposage dans des atmosphères à humidité variable.
Exemple : Influence des variations de l'humidité relative ambiante sur la teneur en eau d'un produit non protégé hygroscopique ;
- ♣ Prévision de la quantité d'eau absorbée en fonction de temps d'entreposage (donc la durée de conservation) ;
- ♣ Prévision de l'influence des variations de température sur l'activité de l'eau d'un produit conditionné dans un emballage imperméable à l'eau (étanche) donc de teneur d'eau constante (Nafti., 2011);
- ♣ La détermination des isothermes de sorption est un moyen indispensable pour la prédiction du transfert d'eau à travers d'un film perméable d'emballage pour denrées alimentaires (Gonzalo et al., 2011).

I.2.1.9.L'activité de l'eau, une mesure d'un grand intérêt pour les aliments:

La mesure de l'activité de l'eau est intéressante dans de nombreux secteurs. Dans le domaine du papier, par exemple, si elle est bien contrôlée, elle permet par exemple de minimiser voire d'éliminer les déformations du papier lors du stockage, d'améliorer la qualité de l'impression couleur, de réduire le temps de séchage des encres d'imprimerie. Mais c'est surtout dans l'agro-alimentaire que l'activité de l'eau trouve ses principales applications (Thomas., 2003).

Les aliments sont des systèmes plus complexes que l'eau, et l'eau peut se lier aux composants de la nourriture. Donc pas toute l'eau dans la nourriture est disponible pour les microorganismes; Ainsi, l'activité de l'eau de la plupart des produits alimentaires est inférieure à 1,0 (FDA., 2016).

La valeur de l'activité de l'eau de divers aliments est prescrite aux États-Unis, depuis 1979 par la FDA (Food and Drug Administration) ; « un produit alimentaire doit pouvoir se conserver, quand son activité d'eau est inférieure à 0.6, seuil en-dessous duquel les microorganismes ne peuvent plus se développer » (Nsren., 2010).

Le système de mesure Rotronic, de l'activité de l'eau est conseillé pour établir cette valeur. Les valeurs d'activité de l'eau en relation avec la croissance des micro-organismes dans les produits alimentaires sont présentées dans le **Tableau V** (Nguyen., 2015).

Tableau V : Activité d'eau et croissance des micro-organismes dans les produits alimentaires selon FDA (Nsren., 2010).

Valeur a_w	Types de microorganismes	Produits alimentaires compris dans ces valeurs
1,00-0,95	<i>Pseudomonas, Escherichia, Proteus, Shigella, Klebsiella, Bacillus, Clostridium perfringens</i> , certaines levures	Produits rapidement altérables (frais) aliments et fruits en boites, légumes, viandes, poisson et laitage, saucisse cuite, pain cuit; produits alimentaires contenant jusqu'à 40% de sucre ou 7% de sel
0,95-0,91	<i>Salmonella Vibrio parahemoliticus, C.botulinum, Serratia, Lactobacillus, Pediococcus</i> , certaines moisissures, Levures (<i>Rhodotouia, Pichia</i>)	Certains fromages (cheddar, suisse, munster, provolone), viande fumée (jambon), quelques concentrés de jus de fruits, produits alimentaires contenant jusqu'à 55% de sucre (saturés) ou 12% de sel
0,91-0,87	Beaucoup de levures (<i>Candida, Torulopsis, Hansenula, Micrococcus</i>)	Saucisse sèche (salami), flans, fromages secs, margarine, produits alimentaires contenant jusqu'à 65% de sucre (saturés) ou 15% de sel
0,87-0,80	La plupart des types de moisissures (<i>Penicillia micotoxiques</i>), <i>Staphylococcus aureus</i> , la plupart des <i>saccharomyces (bailii)</i> spp, <i>Deboryamyces</i>	La plupart des concentrés de jus de fruits, lait concentré sucré, sirop de chocolat, d'érable et de fruits, farines, riz et légumes secs avec 15-17% d'eau ; gâteaux aux fruits ; saucisses fumées, fondants
0,80-0,75	La plupart des bactéries halophiles, aspergilli micotoxique	Marmelades, gelées de fruits, pâte d'amande, fruits confits, certains marshmallows
0,75-0,65	Moisissure xérophiles (<i>Aspergillus chevaliers</i>), <i>A.Candidus</i> , <i>Wallemia sebi</i>), <i>saccharomyces bisporus</i>	Flacons d'avoine avec 10% d'eau, nougats, fondants, Marshmallows, bouillies, mélasses, sucre brut, certains fruits secs, noix
0,65-0,60	Levures osmophiles (<i>Saccharomyces rouxi</i>), certains moisissures (<i>Aspergillus</i>)	Fruits secs avec 15-20% d'eau ; certains toffes et caramels ; miel

<i>echinulatus, Monascus bisporus)</i>		
0,5	Pas de croissance microbologique élevée	Pâtes alimentaires avec 12%d'eau ; épices avec 10 % d'eau
0,4		Œufs en poudre avec 5 %d'eau environ
0,3		Cakes, biscuits secs, croûte de pain ...avec 3-5% d'eau environ
0,2		Poudre de lait avec 2-3 % d'eau environ, flacons de céréales avec 5% d'eau environ, gâteaux aux fruits, cakes rustiques biscuits secs.

La teneur en eau et l'activité de l'eau influencent fortement la vitesse des processus chimiques, biochimiques et biologiques. Par exemple, le contrôle de l'activité de l'eau permet d'accélérer ou retarder un processus d'oxydation. L'activité de l'eau influence également la stabilité des enzymes dans les denrées alimentaires. Elle a également un effet sur les substances nutritives : la vitamine C (l'acide ascorbique) est stable aux faibles valeurs d' a_w , et décompose en présence d'une forte humidité ainsi que la thiamine (vitamine B1).

L'activité de l'eau a également une très grande incidence sur l'activité microbienne (croissance, germination, sporulation et production de toxines) (Thomas., 2003).

Le tableau V permet de comprendre la notion de denrée périssable ($a_w \geq 0,87$) et de denrées non-périssables pouvant être gardées très longtemps en l'absence d'eau ($a_w < 0,6$) (Marc., 2014).

Ainsi, c'est lorsque l' a_w est comprise entre 0,2 et 0,3 que le produit se conserve le mieux (Nguyen., 2015).

Les aliments à faible teneur en eau tableau V (c'est-à-dire., Les aliments ayant une activité d'eau inférieure à 0,60) (FDA., 2016) les micro-organismes sont inhibés (Thomas., 2003), ils ont une durée de conservation prolongée, même sans réfrigération (FDA., 2016).

Les aliments à l'humidité intermédiaire **tableau V** (c'est-à-dire les aliments avec des activités d'eau comprises entre 0,60 et 0,85) ne nécessitent pas de réfrigération pour contrôler les agents pathogènes, mais ils peuvent avoir une durée de conservation limitée en raison de la détérioration, principalement par levure et moisissure.

La stabilité microbiologique des aliments à l'humidité intermédiaire peut dépendre de facteurs autres que l'activité de l'eau, tels que la réduction du pH, des conservateurs chimiques, des traitements thermiques ou des combinaisons de ceux-ci, même si l'activité réduite de l'eau est d'une importance majeure (**FDA., 2016**).

Les aliments humides **tableau V** (c'est-à-dire les aliments ayant une activité d'eau supérieure à 0,85) nécessitent une réfrigération ou une autre barrière pour contrôler la croissance des agents pathogènes (**FDA., 2016**).

1.2.2. Le traitement thermique:

La sensibilité des micro-organismes à la température en fait un aspect clé de leur développement. Quant à la température c'est un facteur sensible sur lequel le professionnel peut facilement agir. Ce facteur est en effet très utilisé pour réguler le développement des micro-organismes (Mcswane et al., 2000). Le traitement thermique, lorsqu'il est possible, permet de détruire les micro-organismes présents sur l'aliment. Cela nécessite d'appliquer le couple temps –température efficace (Carbonel., 2007).

On distingue différentes catégories des micro-organismes. Les cryophiles sont capables de se développer en dessous de 15-20°C, y compris pour certains jusqu'à des températures négatives (les cryophiles obligatoires ne sont pas capables de se développer à 20°C). On trouve dans ce groupe de nombreuses bactéries de la flore Gram – saprophytes (*Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*...) et des moisissures (*Cladosporium*, *Sporotrichum*...). Les mésophiles qui comprennent la majorité des micro-organismes se développent entre 15 et 45°C. Les thermophiles sont capables de se développer au-dessus de 45°C jusqu'à 75-80°C (les thermophiles obligatoires ne sont pas capables de se développer à 37°C). On trouve dans ce groupe des bactéries lactiques (*Lactobacillus «thermobacterium»*, *Propionibacterium shermani*), des bactéries sporulées (*Clostridium thermosaccharolyticum*, *Bacillus stearothermophilus*), certains champignons ascomycètes.

Il ne faut pas confondre micro-organisme thermophile et thermorésistant. La thermorésistance est l'aptitude à résister à un traitement thermique alors que la thermophilie est son aptitude à se développer à haute température (Dupin et al., 1992).

1.2.2.1. Définition de traitement thermique

Le traitement thermique est un procédé de nature physique appliqué en industrie de transformation alimentaire pour réduire le nombre total de microorganismes. La résistance à la chaleur des microorganismes varie en fonction de leur nombre et de la résistance intrinsèque au genre et à l'espèce. Pour inactiver adéquatement les microorganismes, plusieurs paramètres ont été établis pour évaluer leur résistance thermique et ajuster la sévérité du traitement en conséquence (Philippe., 2012).

I.2.2.2. Mesure des traitements thermiques

I.2.2.2.1. La valeur-D

Le temps de réduction décimale (*D*) ou la valeur de *D* est un paramètre qui consiste à déterminer le temps (seconde ou minute) nécessaire pour tuer 90% de la population du microorganisme cible à une température (°C) spécifique. **(Philippe., 2012).**

Autre paramètre déterminé expérimentalement, la valeur-*z*.

I.2.2.2.2. La valeur-Z

Elle équivaut à la montée en température nécessaire pour diminuer la valeur-*D* de 90% **(Philippe., 2012).**

C'est-à-dire l'accroissement de température nécessaire pour réduire *D* à 1/10 de sa valeur ou pour la réduire d'un log quand le logarithme de *D* est porté en graphique en fonction de la température **(Prescott et al., 2010).**

I.2.2.3. Effet de traitement thermique sur les microorganismes:

La chaleur humide tue le microorganisme par dénaturation des acides nucléiques, des protéines de structure et des enzymes **(Farkas., 2007)**. D'une façon générale, la stabilité thermique des ribosomes correspond à la température maximale de croissance d'un microorganisme. Les membranes cytoplasmiques semblent être les sites majeurs de dommages causés par la chaleur humide. Les microorganismes y sont plus sensibles qu'à la chaleur sèche, du fait la forte influence de l'activité de l'eau **(Lund et al., 2000)**.

En effet, la chaleur sèche nécessite de plus hautes température et de temps de chauffage plus longs pour arriver au même taux de destruction **(Katzin et al., 1942)**.

I.2.2.4. Influence de la température sur la physiologie d'*E. coli*

La température influence la croissance, la physiologie et la survie des microorganismes. Étant en microorganisme entérique mésophile, la température optimale de croissance d'*E. coli* est de 37°C **(Doyle et Schoeni., 1984)**.

Dans des milieux de culture synthétiques, la température minimale de croissance de la bactérie se situe entre 6 et 7°C, tandis que la température maximale se situe approximativement à 45,5°C (Nauta et Dufrenne., 1999; Gonthier et al., 2001). De fait, les traitements à basse température ne font que ralentir ou arrêter la croissance microbienne. Leur effet létal est minimal.

De plus, la température de réfrigération permet la survie de la bactérie à des pH et à des teneurs en NaCl défavorables à sa croissance (Zanoni et al., 1993). Au point de congélation, la formation de cristaux de glace provoque d'importants dommages cellulaires aux microorganismes.

Cependant, le taux de mortalité est difficile à déterminer, car il dépend de plusieurs facteurs, dont la vitesse de formation et la taille des cristaux de glace, la température de stockage et la méthode de décongélation. Toutefois, il a été démontré qu'*E. coli* 0157:H7 pouvait survivre plus d'un an à des températures de congélation de -20°C, pour 9 des 23 échantillons évalués par méthode immunologique de type ELISA (Milley et Sekla., 1993).

À l'inverse, *E. coli* n'est pas considéré comme étant thermorésistant. Ainsi, les traitements thermiques tels que la pasteurisation se sont montrés efficaces pour la détruire.

Sur le plan physiologique, la paroi de la membrane cellulaire des eubactéries est composée d'une double couche de phospholipides. Le maintien d'un certain niveau de fluidité de cette membrane joue un rôle essentiel dans l'entrée des nutriments et dans le pompage des ions (Russell., 1990). Une baisse de température engendre une perte de la fluidité des phospholipides et vient compromettre les fonctions cellulaires. Chez *E. coli*, ainsi que plusieurs autres microorganismes, la cellule a recours à un mécanisme permettant de changer le niveau de saturation des chaînes carbonées de la couche de phospholipides. Il a été démontré chez *E. coli* qu'à une température de 15°C, le contenu en acides gras insaturés de la membrane cellulaire augmente en acides palmitoléiques et en acide oléique tandis que survient une diminution des acides gras saturés tel que l'acide palmitique (Katsui et al., 1981).

Ce changement permet de réduire le point de fusion des phospholipides, et par le fait même, d'accroître la fluidité membranaire (Garwin et Cronan., 1980; De Mendoza et al., 1983). Inversement, à 37 °C, la membrane augmente sa quantité en acides gras saturés tandis que celle en acides gras insaturés diminue (Katsui et al., 1981).

Une autre stratégie développée par les microorganismes pour se protéger des variations de température est la synthèse de trihalose.

La production de ce disaccharide est un mécanisme qui a été conservé au fil de l'évolution puisqu'il est présent chez plusieurs organismes, incluant levures et les plantes. Chez *E. coli*, le trehalose protège la bactérie contre les chocs osmotiques (**Strôm et Klaasen., 1993**), la dessiccation (**Welsh, et Herbert., 1999**) et confère une protection mineure aux cellules en phase stationnaire face à la chaleur (**Hengge-Aroniset al., 1991**).

La synthèse de tréhalose joue aussi un rôle important dans la survie de la bactérie à basse température. **Kandror et al., (2002)** ont démontré que des *E coli*-mutants, incapables de synthétiser le trehalose, subissaient une réduction de viabilité à 4°C. Le mode d'action du trehalose à basse température reste encore inconnu.

Les effets de la température influencent aussi la synthèse protéique chez *E. coli*. Un passage rapide de 37°C à 15°C provoque une baisse temporaire du nombre des polyribosomes et un arrêt provisoire de la synthèse protéique (**Jones et Inouye., 1996**) qui s'explique par un blocage de l'initiation de la traduction des ARN messagers (**Leimaux et al., 1978**).

I.2.3. Le pH:

Il est égal au cologarithme de la concentration en H_3O^+ , il détermine l'acidité ou la basicité d'un milieu et peut varier entre zéro et 14. (Branger et al., 2007).

I.2.3.1. Le pH et les produits alimentaires:

L'addition d'acides organiques (acide acétique, citrique, lactique) à une denrée alimentaire se traduit par une diminution de son pH qui a un effet sur la croissance des micro-organismes.

Le pH de certains produits alimentaires est indiqués dans le **tableau(VI)** .Il est bon de rappeler ici que par rapport à ce paramètre, nos aliments sont classés en deux groupes : ceux dont le pH est inférieur à 4,5 et ceux dont le pH est supérieur à 4,5 dans lesquels les risques microbiologiques sont beaucoup plus grands (risques de croissance de *Clostridium botulinum*) (Dupin et al., 1992).

Tableau VI : valeurs de pH de quelques produits alimentaires (Dupin et al., 1992).

Aliment	pH
Bœuf	5,1-6,2
Canard	6,0-6,1
Crabe	7,0-7,1
Crevette	6,8-7,0
Huître	4,8-6,3
Jambon	5,9-6,1
Maquereau	5,9-6,2
Morue	6,0-6,2
Poissons(en général)	6,6-6,8
Poissons blancs	5,5
Poulet	6,2-6,4
Sardine	5,7-6,6
Saucisse(Francfort)	6,2
Saumon	6,1-6,5
Veau	6,0-6,21

Beurre	6,1-6,4
Crème	6,5
Fromages	4,5-5,9
Lait de vache	6,5-6,8
Parmesan	5,2
Roquefort	4,7
Hachis	5,5-6,2
Porc+haricots	5,1-5,8
Soupe de	6,3-6,7
Champignon	5,1-5,8
Soupe de haricots	5,5-6,5
Soupe de poulet	6,0-6,2
Soupe de viande	5,0-6,1
Asperge	4,2-5,8
Hetterave	4,9-5,6
Carotte	5,7-6,0
Célieri	6,0-6,5
Champignon	5,4-6,0
Choux	6,3
Choux de Bruxelles	2,6-3,8
Concombre	4,8-6,0
Epinard	4,8-5,5
Haricot	4,9-5,5
Haricot vert	6,0-6,2
Laitue	6,1-7,0
Maïs	5,2-5,5
navet	5,3-5,8
oignon	3,6-3,8
olive	5,9-7,3
olive mûre	5,7-6,0
Persil	4,3-4,9
Piment	5,6-6,5
Pois	5,4-5,9

Pomme de terre	4,2-4,5
Tomate	2,3-2,5
Airelle	3,5-4,1
Ananas	4,5-4,7
Banane	3,0-3,4
Cassis	3,4-3,6
Cerise	2,2-2,6
Citron	6,2-6,4
Datte	4,6-5,0
Figue	5,2-5,6
Melon	3,0-4,2
Mûre	3,2-3,6
Myrtille	3,0-4,3
Orange	3,2-3,4
Pamplemousse	3,4-4,2
Pêche	3,8-4,6
Poire	2,9-3,5
Pomme	2,8-3,0
Prune	3,5-4,5

I.2.3.2. Le pH et le développement des micro-organismes :

Le comportement des micro-organismes par rapport au pH est variable. Le tableau VII donne quelques exemples. On appelle acidophiles les micro-organismes dont le pH optimum se situe au – dessous de 5,5 mais, en industrie alimentaire, on a l’habitude de classer les micro-organismes entre ceux qui peuvent se développer en dessous du pH 4,5 et les autres.

Le pH 4,5 permet de séparer les aliments en deux groupes par rapport à leur aptitude à permettre la croissance des principales bactéries pathogènes.

En dessous de ce pH les risques sanitaires sont minimes car le développement ou l’activité néfaste de ces bactéries n’est pas possibles, au – dessus ils sont importants, en particulier le risque lié à la présence de *Clostridium botulinum*. (Dupin et al., 1992).

Tableau VII: Développement de quelques micro-organismes en fonction du pH (Dupin et al., 1992).

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Exemples	Estomac	vinaigre		Fromages	Eau /Lait		sol alcalin			
	Jus de citron	Tomate/vin		Viandes/légumes	Eau de mer		Détergents			
Escherichia coli				4,3					9,5	
Salmonella typhi				4					9,6	
Vibrio cholerae					5,6				9,8	
Brucella melitensis							6,3		8,4	
Mycobacterium Tuberculosis					5				8,4	
Lactobacillus spp				3,8			7			
Bacillus subtilis					4,5				8,5	
Acetobacer spp		2					7,5			
Clostridium Botulinum					5				8,5	
Levures				2,5				8		
Moisissures	1,5									>10



Matériel et Méthodes

II.1. Cadre:

La partie expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire pédagogique de microbiologie à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre à l'Université Djilali Bounâama khemis Miliana-Ain Defla pendant la période allant de Février 2017 jusqu'à Mars 2017.

II.2. Matériel biologique:

II.2.1. Micro-organisme utilisé:

La souche bactérienne utilisée est *Escherichia coli* ATCC 25922, c'est une souche de référence non pathogène, isolée de patients hospitalisés par des infections urinaires, fournie par les responsables de laboratoire des analyses médicales de ZIBOUCHE de Ain Defla.

La souche est conservée à 4°C dans le milieu Tryptone Soy Broth (TSB), additionné de 0.6% d'extrait levure (EL). A partir de ces-tubes conservés, un ensemencement en stries est réalisé dans des boîtes de Pétri de TSA+0.6% EL (Tryptone Soy Agar) pour une conservation de plus courte durée.

II.2.2. Milieux de culture:

Suivant les méthodes employées, et selon la souche, nous avons utilisé les milieux de culture suivants:

- ♣ Le TSB milieu liquide utilisé pour la conservation de souche, la pré-culture et la culture de 24h.
- ♣ Le TSA YE milieu solide utilisé pour la culture (coulage des boîtes de Pétri).
- ♣ Milieu de traitement: Tampon McIlvaine pH4.0 et pH7.0.
- ♣ L'eau physiologique.

(la composition de ces milieux est décrite dans l'annexe).

II.3. Méthodes:

II.3.1. Conservation de souche:

La souche que nous avons utilisée a été déjà au préalable confirmée sa pureté par le service de laboratoire des analyses médicales de ZIBOUCHE de Ain Defla.

À partir de cette souche, nous avons fait des repiquages dans des tubes de gélose de conservation en piqûre centrale et incubation à 37°C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite conservés dans le réfrigérateur à 4°C. Les repiquages sont réalisés tous les 10 jours pour garder toujours la disponibilité en souche.

II.3.2. Préparation de milieu de traitement (Tampon McIlvaine):

♣ Pour préparer 20 ml de solution tampon McIlvaine à pH 4,0:

-Une solution mère de phosphate di-sodique (Na_2HPO_4) 0,2 M a été préparée en introduisant 28.392 g de phosphate di-sodique dans une fiole de 1000 ml, avec 1l d'eau distillée, la solution a été bien agitée à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à la dissolution complète du produit.

-D'autre part une solution d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0.1 M a été préparée en introduisant 19.21 g d'acide citrique dans une fiole 1000 ml, avec 1l d'eau distillée.

-Dans un bécher de 500 ml ,7.71 ml de la solution de phosphate di-sodique 0.2 M a été mélangée avec 12.29 ml de la solution d'acide citrique 0.1 M avec agitation sur l'agitateur magnétique. Le pH de la solution a été mesuré et ajusté avec l'acide ou la base correspondants (acide citrique ou phosphate di sodique).

♣ Pour préparer 20 ml de solution tampon McIlvaine à pH7.0 :

-16.47 ml de solution de phosphate di-sodique 0.2 M a été mélangé avec 3.53 ml d'acide citrique 0.1 M. le pH a été ajusté jusqu'à l'obtention de pH 7.0.

♣ Pour préparer 500 ml de solution tampon McIlvaine à pH4.0 et à pH7.0 ,il suffit de compléter au volume nécessaire avec l'eau distillée dans chaque bécher. Le pH ne varie pas parce que c'est un tampon. S'il y a une petite variation, ajusté avec de l'acide citrique ou le phosphate di sodique.

-La mesure de pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre étalonné.

-Les deux solutions (tampons McIlvaine à pH4.0 et à pH7.0) sont ensuite remplies dans des tubes à essais; dont chaque tube contient 10ml.

II.3.3. Préparation de l'eau physiologique:

♣ Pour préparer 1000 ml de l'eau physiologique:

9g de NaCl a été introduit dans une fiole de 1000ml avec 1l d'eau distillée, la solution a été bien agitée à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à la dissolution complète du produit.

II.3.4. Stérilisation :

Tous les milieux préparés précédemment ont été stérilisés dans l'autoclave à 121°C pendant 15min.

II.3.5. Préparation de suspension bactérienne:

II.3.5.1. Préparation de pré-culture et la culture de 24h :

Dans la zone stérile, une colonie d'*Escherichia coli* bien isolée blanchâtre a été sélectionnée.

À l'aide d'une anse stérilisée, cette colonie a été ensemencée dans un tube à essai contenant 5 ml de bouillon de TSB stérile avec 0,6 % d'extrait de levure (TSBYE);

le tube est ensuite agité à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

Le deuxième repiquage est effectué dans un flacon de 50ml de TSB à partir de 100µl de la suspension bactérienne de 24h de telle manière que la concentration du milieu soit ajustée à 10⁹ UFC/ml. Ce flacon a été incubé à 37°C pendant 24h jusqu'à ce que la phase stationnaire de croissance a été atteinte (Figure 5).

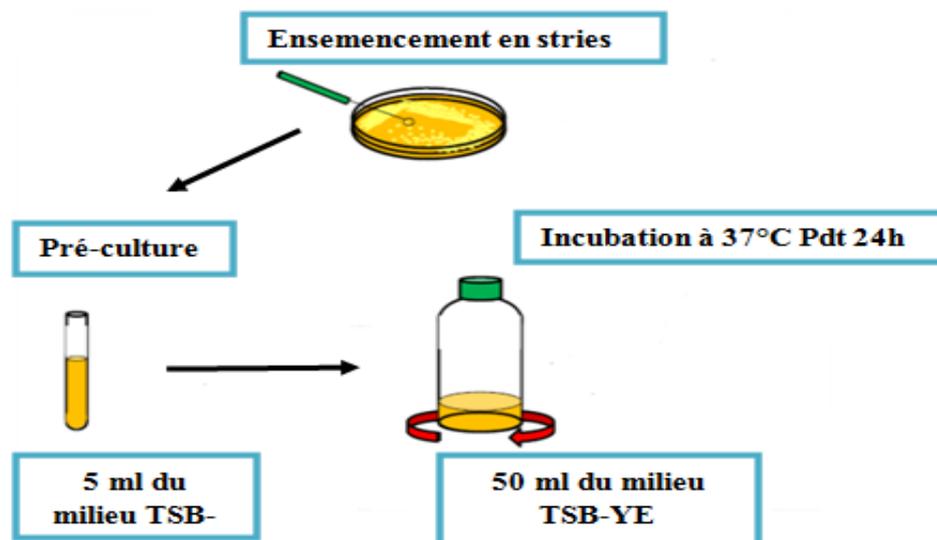


Figure 5. Procédure de mise en culture des souches.

II.4. Etude de l'activité de l'eau :

En premier, nous avons choisi une gamme d'activité d'eau allant de 0.90 à 0.96.

Pour étudier l' a_w nous avons ajouté aux tubes d'essais de 10 ml de McIlvaine pH4 et pH7 préparés précédemment différentes masses de NaCl (en g) selon le **tableau** ci-dessous, les tubes de Mc ont été agités à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes puis stérilisés dans l'autoclave à 121°C pendant 15min.

Tableau VIII : Diminution de l'activité de l'eau par le NaCl (USFDA, The Bad Bug Book, 1997).

Na Cl (g)	Eau (g)	Na Cl %	Activité de l'eau (a_w)
7.0	93.0	7.0	0.96
10.0	90.0	10.0	0.94
13.0	87.0	13.0	0.92
16.0	84.0	16.0	0.90

II.4.1. Effet de l'activité de l'eau sur *E. coli* à température ambiante:

A l'aide d'une micropipette de 1000 μ l, chacun des microtubes eppendorf stériles ont été remplis avec 900 μ l de l'eau physiologique. A partir de flacon de 50 ml de culture de 24h:

Deux microtubes eppendorfs stériles ont été remplis par 1 ml de la culture bactérienne de 24 heures qui est à la phase stationnaire de concentration 10^9 UFC/ml; ils sont ensuite centrifugés à 3000 trs pendant 5 min à 10°C. Après la centrifugation, la culture est bien séparée en deux phases : Le surnageant (TSB) et le culot (précipite bactérienne).

Le surnageant TSB a été éliminé par une seringue et remplacé par :

- ✓ 1ml de McIlvaine pH4 (sans NaCl) dans le premier microtube eppendorf;
- ✓ 1ml de McIlvaine pH7 (sans NaCl) dans le deuxième microtube eppendorf;

Ces deux microtubes eppendorfs ont été agités à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes pour bien homogénéiser cette suspension bactérienne (**figure 6**).

A partir de ces deux microtubes eppendorfs:

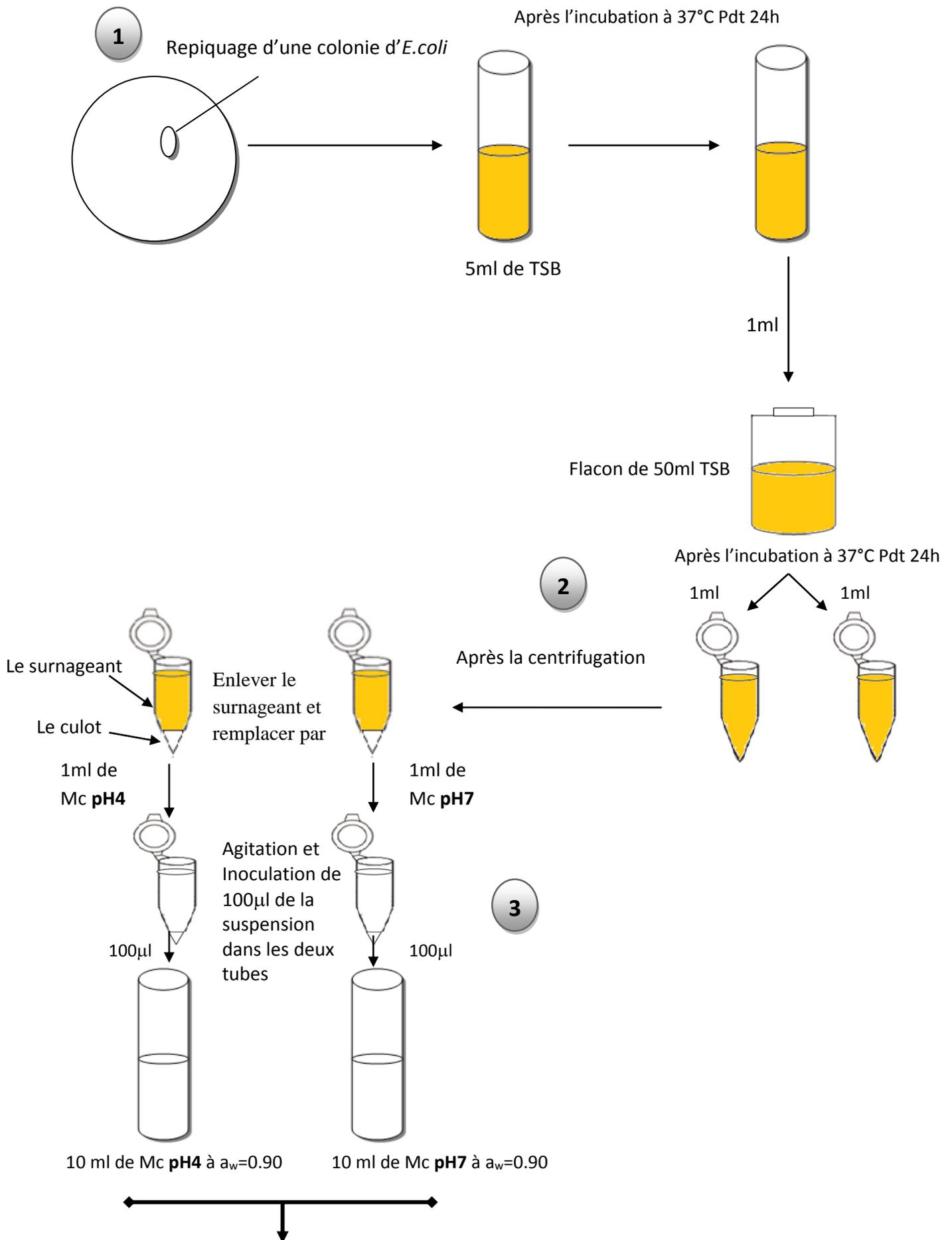
- 100 μ l de la suspension a été ajoutée par la micropipette de 100 μ l dans les tubes qui contiennent 10 ml de Mc pH4.0 et pH7.0 à des activités d'eau choisies : 0.90, 0.92, 0.94, 0.96,

pour atteindre une finale concentration de 10^7 UFC/ml, la concentration recommandée par la **FDA**. Ces tubes de Mc pH4.0 et pH7.0 ont été agités à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes (**figure 6**).

-Dès qu'on a met 100 μ l dans les tubes, le chronomètre est commencé. À des intervalles prédéfinis (**Hassani et al., 2005**) (après 0.16h et 4h) des échantillons de 100 μ l ont été prélevés et dilués dans les séries des dilutions appropriées précédemment préparées (**Hassani et al., 2005**), puis un coulage du milieu gélosé TSA YE est effectué après l'adjonction de la suspension bactérienne dans les boîtes de Pétri (**figure 6**).

Après le transfert de 100 μ l de la suspension et de ses dilutions décimales successives (de 10^{-1} à 10^{-3}) dans des boîtes de Pétri stériles, nous avons coulés environ 15ml de milieu TSAYE par boîte dans la zone de stérilisation (l'ensemencement au profond) et les homogénéisés par des mouvements de huit, dans les deux sens.

Après la solidification à coté de bec Bunsen, les boîtes de Pétri ont été incubés à 37°C pendant 24h à 48h. Des expériences antérieures ont montré que de plus longues durées d'incubation n'ont pas influencé les chiffres de survivant (**Hassani et al., 2005**).



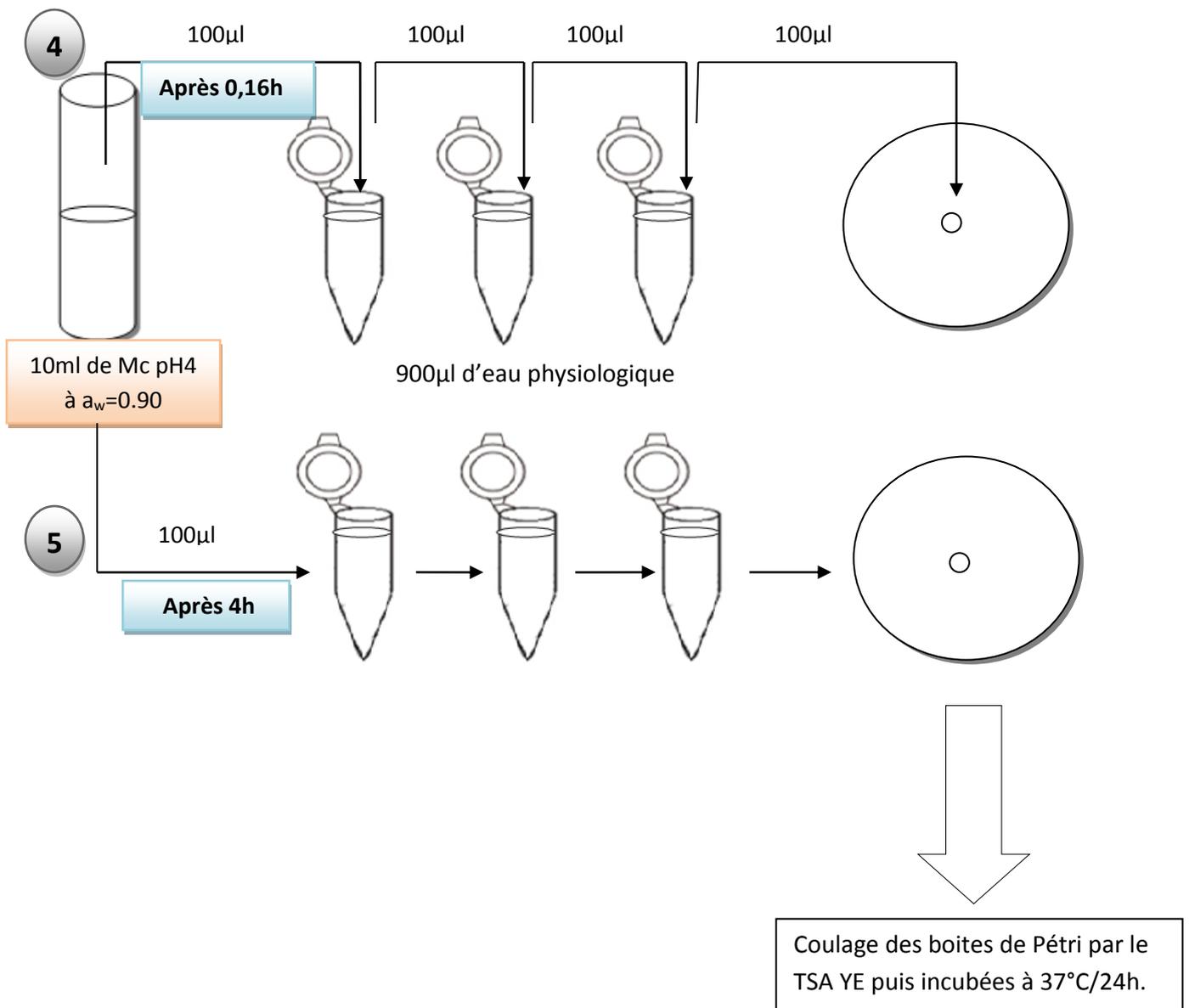


Figure 6. Schéma décrivant les étapes du protocole expérimental pour étudier l'effet de l' a_w sur l'inactivation d'*E. coli* ATCC 25922 à température ambiante.

Après l'incubation, les colonies ont été comptées avec un compteur des colonies.

Nous avons répétés la manipulation 2 fois pour éviter les erreurs.

II.4.2. Effet de traitement thermique en combinaison avec l'activité de l'eau sur *E. coli* évaluée in «*in vitro*»:

II.4.2.1. Protocole expérimental

Nous avons diminué la température de pasteurisation au moyen de 60°C, pour garder la qualité nutritionnelle et organoleptique du produit.

On a suivi les étapes suivantes: (**Figure 7**)

- 1) à l'aide des eppendorfs stériles, nous avons centrifugé 1 ml de suspension bactérienne de 24 heures qui est à la phase stationnaire de concentration 10^9 UFC/ml à 3000 trs pendant 5 min à 10°C.

Après la centrifugation, la culture est bien séparée en deux phases : Le surnageant(TSB) et le culot (précipite bactérienne). Le surnageant est éliminé et remplacé par 1ml de Mcllvaine de pH4.0 et agité bien à l'aide d'un vortex.

- 2) Le bain marie à été préalablement préparé à $60^\circ\text{C} \pm 2$, une fois que la température de traitement a été atteinte (confirmé par le thermomètre), la suspension microbienne (100µl) est ajoutée par la micropipette à une finale concentration de 10^7 UFC/ml (la concentration recommandée par la **FDA**), inoculée directement dans le tube contenant 10 ml de Mcllvaine pH4.0 à $a_w=0.90$ qui à été placé dans le bain marie sous agitation constante.

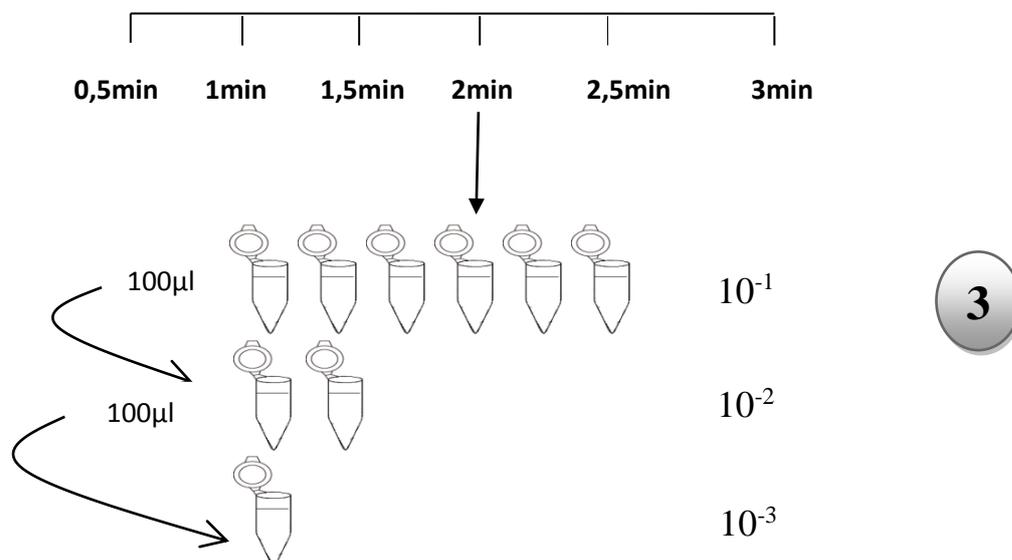
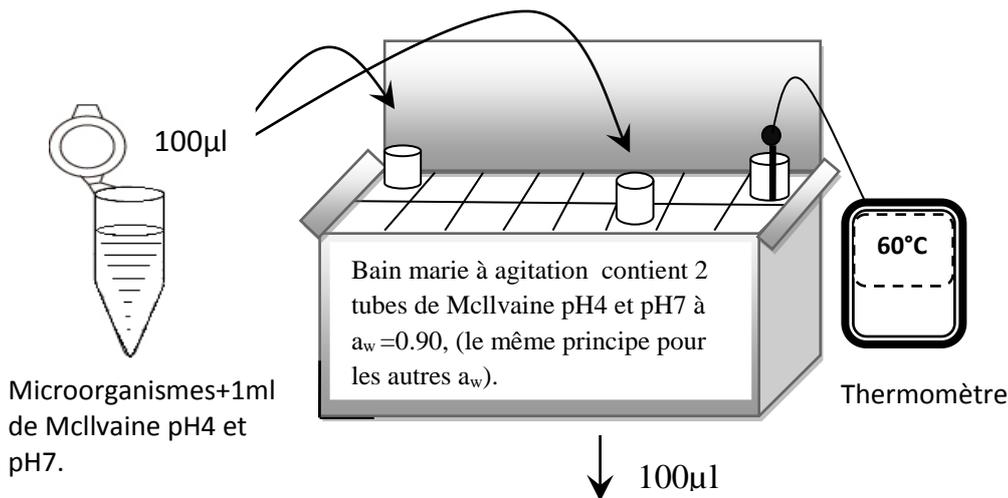
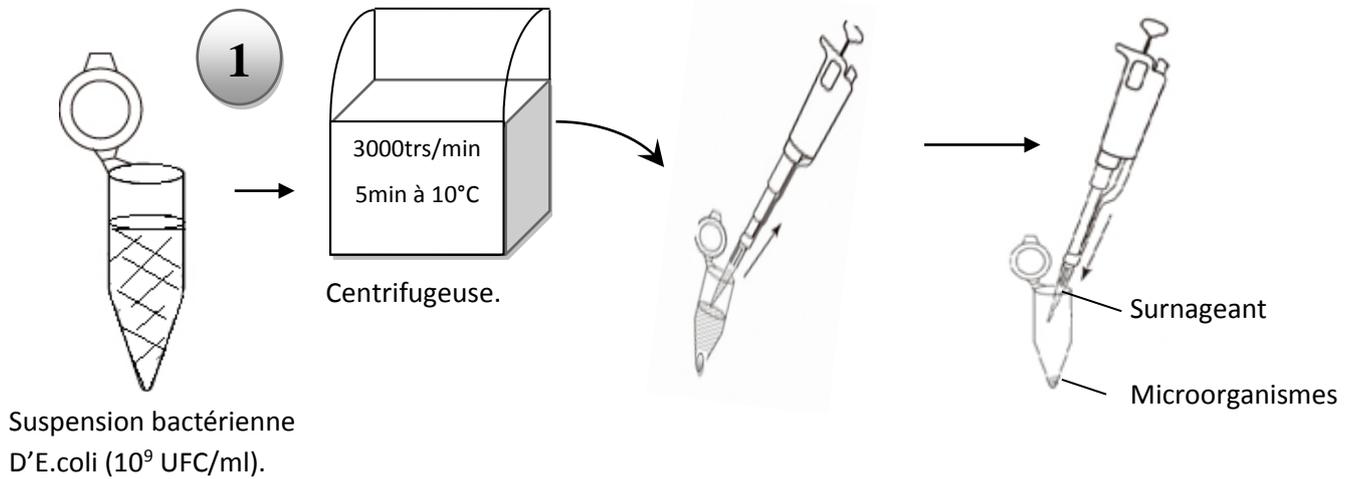
(La même manipulation est réalisée pour les tubes de Mcllvaine pH4.0 à $a_w=0.92$; $a_w=0.94$ et $a_w=0.96$).

Dès qu'on a met 100µl de la suspension dans les tubes, le chronomètre est commencé.

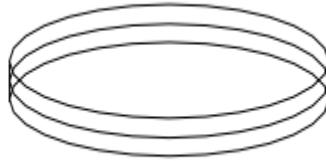
- 3) Chaque 30s et jusqu'à atteindre 3min, on a prélevé 100µl, puis nous avons fait les dilution 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dans les eppendorf contenant 900µl de l'eau physiologique stérile.
- 4) On a versé le 100µl de chaque dilution dans les boites de Pétri et coulés avec la gélose de TSA YE, bien homogénéisés, et laissés refroidir dans la zone stérile.
- 5) On a met les boites dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures, puis nous avons lu les résultats.

→ Le même principe est utilisé pour les tubes contenant 10 ml de Mcllvaine pH7.0 à $a_w=0.90$; $a_w=0.92$; $a_w=0.94$ et $a_w=0.96$ qui sont placés dans le bain marie sous agitation constante.

→ Nous avons répété la manipulation 2 fois pour chaque pH pour éviter les erreurs.



100 μ l de chaque dilution est inclus dans le boite de Pétri. Puis une couche de T.S.A est coulée, homogénéisé de façon 8 et laisser refroidir.

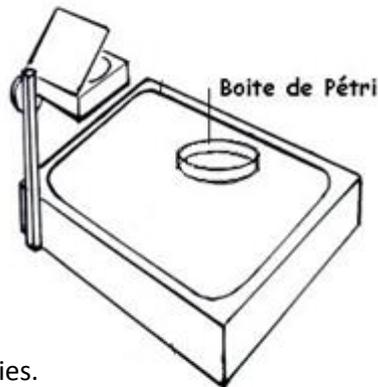


4

Mises les boites dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

5

Décantée les boites.



Décanteur des colonies.

Figure 7. Schéma décrivant les étapes du protocole expérimental pour étudier l'effet de l' a_w combiné avec un traitement thermique à 60°C sur l'inactivation d'*E.coli* ATCC 25922.



Résultats et Discussion

III.1.1. Etude de l'activité de l'eau:

III.1.1.1. Effet de l'activité de l'eau sur *E. coli* à température ambiante:

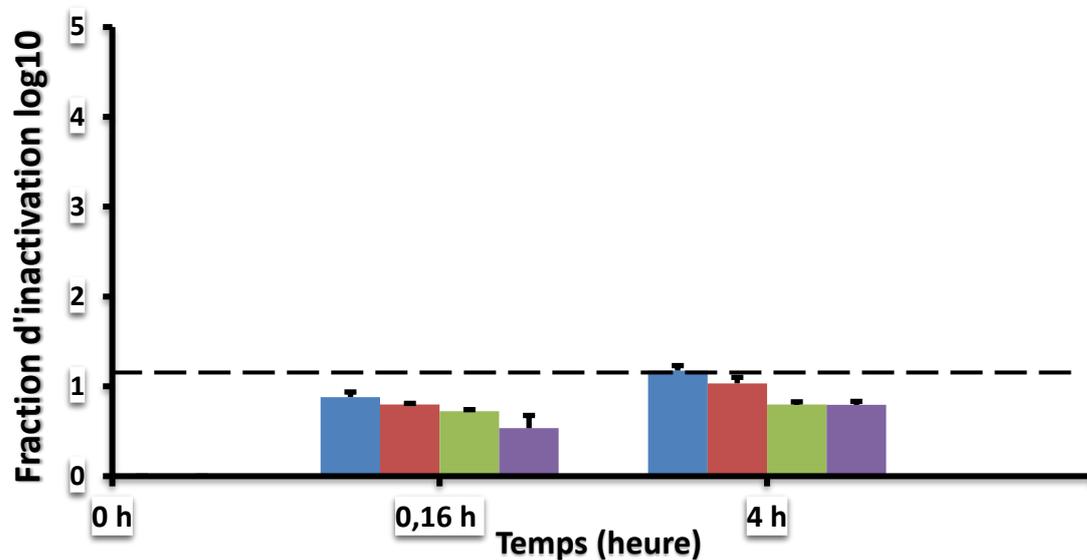


Figure 8. Effet inhibiteur de différentes activités d'eau ($a_w=0.90$ (■) ; $a_w=0.92$ (■) ; $a_w=0.94$ (■) ; $a_w=0.96$ (■)) en fonction de temps vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH4 à température ambiante. Les données représentent les moyennes \pm écart type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

Le graphe illustré par la **figure 8** montre l'effet inhibiteur de différentes activités d'eau ($a_w=0.90$; $a_w=0.92$; $a_w=0.94$; $a_w=0.96$) en fonction de temps vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH4 à température ambiante.

A travers ce graphe, on remarque que l'activité de l'eau exerce une activité inhibitrice à pH4 et à température ambiante.

Cette activité est non significative durant les premières 10 min, mais qui augmente au fur et à mesure qu'on avance dans le temps (4h) surtout lorsque l' a_w atteint 0.90 et 0.92.

Il y a une diminution remarquable de la croissance bactérienne, atteignant l'inactivation d' 1.18 cycle logarithmique au bout de 4h, contrairement au bout de 10min où l'inactivation bactérienne atteint moins d'1 cycle logarithmique.

On remarque aussi que la diminution de la croissance bactérienne est augmentée au fur et à mesure que l' a_w est diminuée (lorsque l' a_w diminue, la diminution de la croissance bactérienne est plus significative); par exemple: la diminution de la croissance quand l' a_w égale 0.90 et 0.92 est plus remarquable que lorsque l' a_w atteint 0.94 et 0.96.

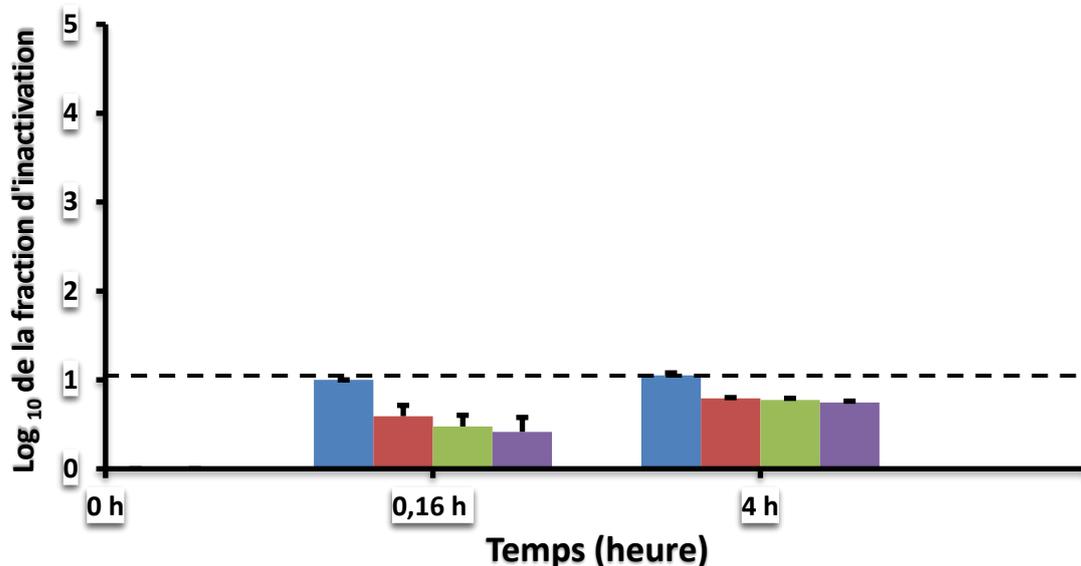


Figure 9. Effet inhibiteur de différentes activités d'eau ($a_w=0.90$ (■); $a_w=0.92$ (■); $a_w=0.94$ (■); $a_w=0.96$ (■)) en fonction de temps vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH7 à température ambiante. Les données représentent les moyennes \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

Le graphe (**Figure 9**) représente l'effet inhibiteur de différentes activités d'eau ($a_w=0.90$; $a_w=0.92$; $a_w=0.94$; $a_w=0.96$) en fonction de temps vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans Mcllvaine pH7 à température ambiante.

On remarque dans ce graphe que les valeurs des activités d'eau testées présentent une activité inhibitrice « *in vitro* » sur *E. coli* ATCC 25922 dans pH7.

Notant ici que cette activité inhibitrice n'est pas significative au bout des 10 min, mais il y a une augmentation au fur et à mesure qu'on avance dans le temps (4h).

La réduction de la croissance bactérienne est considérable, atteignant l'inactivation d'1 cycle logarithmique (pour $a_w=0.90$), mais moins d'un cycle pour les a_w 0.92; 0.94; 0.96,

remarquant que l'augmentation de l'inactivation bactérienne est combinée avec la diminution de l' a_w de la bactérie *E. coli*.

L'inactivation bactérienne a atteint 1 cycle dans les 4h suivantes, remarquant qu'elle augmente aussi lorsque l' a_w diminue (considérable à $a_w=0.90$).

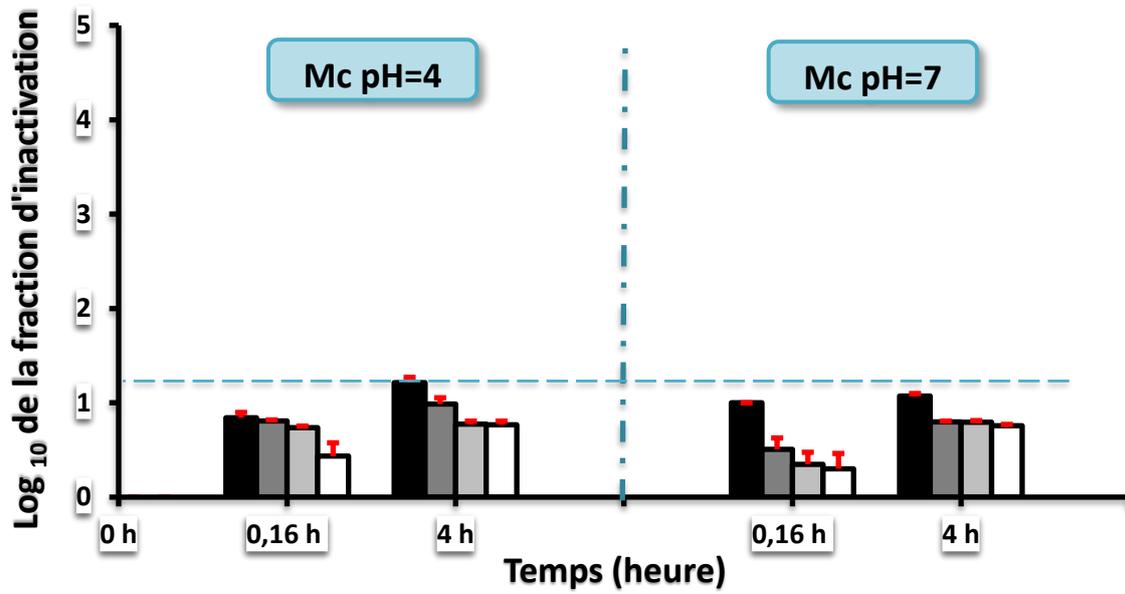


Figure 10. Graphe récapitulatif représente l'effet inhibiteur de différentes activités d'eau ($a_w=0.90$ (■) ; $a_w=0.92$ (■) ; $a_w=0.94$ (□) ; $a_w=0.96$ (□)) en fonction de temps vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans McIlvaine pH4 et pH7 à température ambiante. Les données représentent les moyennes \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes pour chaque pH.

La **figure 10** représente un graphe récapitulatif qui montre l'effet inhibiteur de pH4 et pH7 combiné avec différentes activités d'eau (0.90; 0.92; 0.94; 0.96) en fonction du temps vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 inoculée dans Mc pH7 et pH4 et à température ambiante.

A travers ce graphe récapitulatif, on note :

- Qu'il y'a une légère résistance d'*E. coli* à pH neutre qu'à pH acide surtout au bout des 10 minutes et dans les activités d'eau allant de 0.96 jusqu'à 0.92.
- Qu'il y'a une diminution considérable de la croissance bactérienne atteignant l'inactivation d'1 cycle logarithmique pour le pH7 et de moins d'1 cycle pour le pH4 au bout de 10 min, par contre au bout de 4h on trouve qu'il y a une inactivation d'1.21 cycle logarithmique pour le pH4 et d'1.07 cycle pour le pH7.

Cette diminution de la croissance est combinée à la variation des valeurs d'activité d'eau de milieu de traitement de 0.96 jusqu'à 0.90, donc la résistance d'*E.coli* qui a une $a_w=0.953$ est diminué.

♣ Globalement:

- ✓ On a enregistré dans tous les cas une diminution de la population bactérienne initiale d'1 cycle logarithmique d'inactivation.
- ✓ On note une différence non significative de l'influence de l'activité de l'eau sur *E. coli* dans l'intervalle des valeurs testées à température ambiante soit à pH4 ou à pH7.
- ✓ D'après les résultats, on peut conclure que l'efficacité de l'activité d'eau concerne le pH de milieu et le facteur de temps.

III.1.1.2. Effet de traitement thermique en combinaison avec l'activité de l'eau sur *E. coli* évaluée in « in vitro »:

Les expériences ont été réalisées sur deux milieux de traitement: un tampon McIlvaine à pH4.0 qui remplace « in vitro » une matrice alimentaire à pH acide (par exemple un jus) et un autre tampon à pH7.0 qui remplace « in vitro » une matrice alimentaire à pH neutre.

On a choisit la bactérie *E. coli* ATCC 25922 pour réaliser le traitement thermique à 60°C combiné à activité d'eau dans les milieux cités précédemment, et faire une comparaison entre les résultats.

On a diminué la température de pasteurisation au moyen de 60°C, pour garder la qualité nutritionnelle et organoleptique du produit.

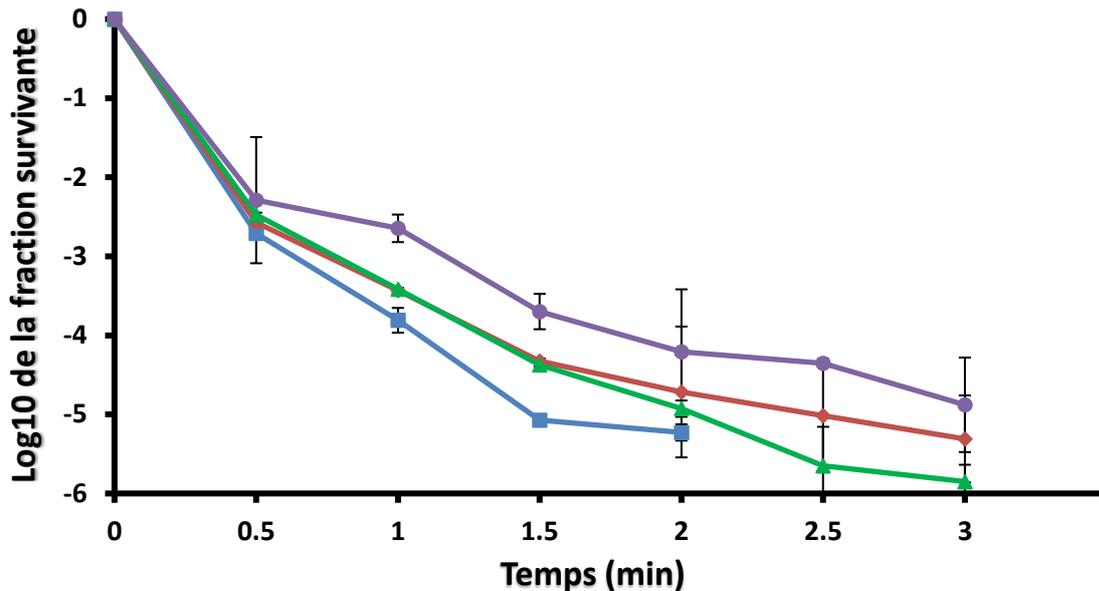


Figure 11. Les courbes d'inactivation d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans McIlvaine pH4 à différentes activités d'eau ($a_w=0.90$ (■) ; $a_w=0.92$ (◆) ; $a_w=0.94$ (▲) ; $a_w=0.96$ (●)) en fonction de temps. Les données représentent les moyennes \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

L'écart type représente plus ou moins la variation des conditions de travail (par exemple le changement de suspension bactérienne, le milieu de traitement, la stabilité de la température de bain marie).

Les courbes de survie ont été obtenues à l'aide d'un logiciel tableur Microsoft Excel version 2007, en traçant la fraction décimale de \log_{10} de survivants en fonction de temps de traitement à des activités d'eau différentes. Les équations calculées grâce à ce logiciel sont les suivantes où le R^2 représente le coefficient de corrélation :

$$a_w=0.90 \text{ (■)} : y = -1,2817x + 0,4813 \quad R^2 = 0,8961$$

$$a_w=0.92 \text{ (◆)} : y = -0,7894x - 0,4667 \quad R^2 = 0,8412$$

$$a_w=0.94 \text{ (▲)} : y = -0,9075x - 0,1825 \quad R^2 = 0,9021$$

$$a_w=0.96 \text{ (●)} : y = -0,7258x - 0,2503 \quad R^2 = 0,8795$$

Les courbes de destruction thermique ont été obtenues à l'aide d'un logiciel tableur Microsoft Excel version 2007 en traçant le \log_{10} du temps décimale pour inactiver les cycles logarithmiques par rapport à leur activité de l'eau correspondante.

Tableau IX. Variation de temps d'inactivation décimale D d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans le tampon McIlvaine pH4 et pH7 à 60°C.

Processus du traitement thermique	Mc à pH4.0	Mc à pH7.0
Traitement thermique à 60°C combiné à $a_w=0.90$ vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml)	2,86260064 min	1,73074216 min
Traitement thermique à 60°C combiné à $a_w=0.92$ vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml)	1,90008483 min	1,90930289 min
Traitement thermique à 60°C combiné à $a_w=0.94$ vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml)	2,01696449 min	2,35491612 min
Traitement thermique à 60°C combiné à $a_w=0.96$ vis-à-vis d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 (10^7 UFC/ml)	1,6835250 min	1,91837416 min

La figure 11 représente les courbes de survie d'inactivation d'*E.coli* ATCC 25922 inoculée dans McIlvaine pH4 à différentes activité d'eau.

Le pH acide rend l'inactivation d'*E.coli* ATCC 25922 dans le tampon McIlvaine à pH4.0 un peu rapide que dans le tampon McIlvaine à pH7.0.

Le temps nécessaire pour inactiver 5 cycles logarithmiques (Figure 11) dans le McIlvaine à pH7.0 à $a_w=0.96$ (favorable par l'*E. coli*) est égale 1.92 min mais dans le tampon McIlvaine à pH4.0 au même a_w est égale 1.68min. Le pH, avec la température, activité de l'eau et le potentiel redox, est un facteur de croissance intrinsèque critique pour les microorganismes et l'un des principaux facteurs de conservation pour les aliments. Il est largement connu que le bas pH inhibe la croissance des microorganismes (Ji-Yeon Leea et al., 2015). On peut dire que cette faible teneur en nutriment dans le jus d'orange rend la bactérie très sensible à l'action du pH, les jus de fruits sont particulièrement sensibles à la chaleur et l'intensité nécessaire pour les pasteuriser provoque la perte irréversible de la saveur. Jusqu'aux récentes décennies, était généralement admis que les agents pathogènes microbiens ne pouvaient proliférer dans les jus de fruits très acides (pH de 3 à 4) (Biljana et al., 2013).

D'après les résultats obtenus (figure 11) on observe qu'il y a une réduction importante du nombre de survivants au cours de traitement atteint à 5 cycles logarithmiques.

Les courbes d'inactivation à $a_w=0.92$ et $a_w=0.94$ réalisées à 60°C sont presque identiques sauf que l'inactivation à $a_w=0.94$ a été plus lente que à $a_w=0.92$ où la valeur de $D_{a_w0.94}=2.01$ min est supérieure au $D_{a_w0.92}=1.90$ min, ça d'une part, d'une autre part on trouve que les courbes d'inactivation de l' $a_w=0.90$ sont lentes par rapport les deux courbes précédentes où la valeur $D_{a_w0.92}=1.90$ min et de $D_{a_w0.94}=2.01$ min. Par contre La vitesse d'inactivation la plus grande est celle réalisée à 60°C et à $a_w=0.96$ ($D_{a_w0.96}=1.68$ min) qui est inférieure deux fois par rapport au celle d' $a_w 0.90$.

Les résultats obtenus montrent que il y a une relation entre l'activité de l'eau et le temps de traitement, sachant que la diminution de l' a_w augmente le temps d'inactivation dans les conditions de l'expérience (à pH acide, à température 60°C , et dans les valeurs d' a_w testés).

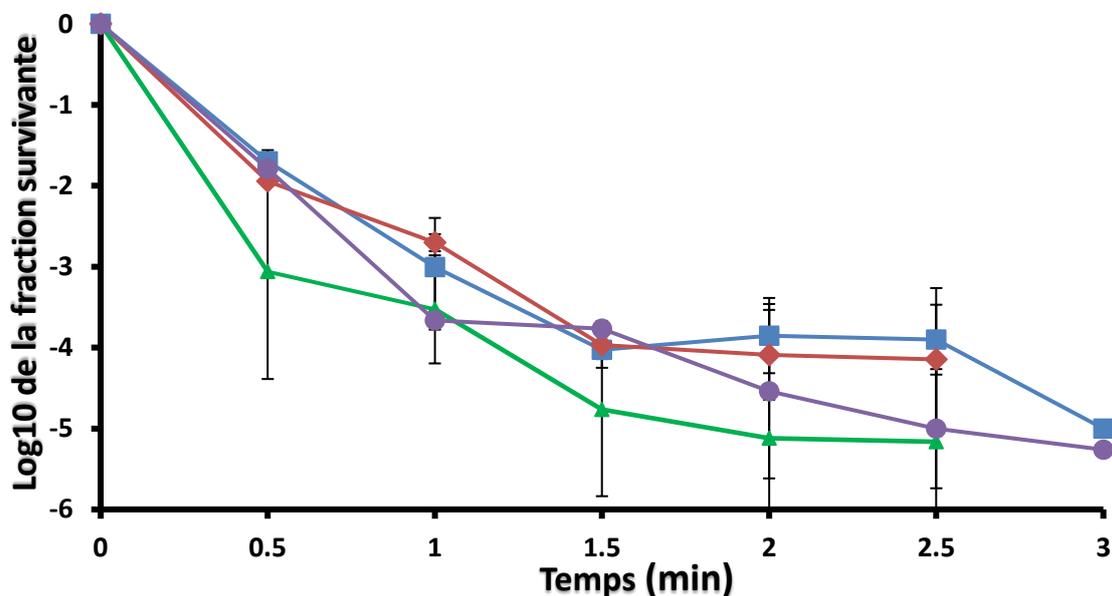


Figure 12. Les courbes d'inactivation d'*E. coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans McIlvaine pH7 à différentes activité d'eau ($a_w=0.90$ (■) ; $a_w=0.92$ (◆) ; $a_w=0.94$ (▲) ; $a_w=0.96$ (●)) en fonction de temps. Les données représentent les moyennes \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

Les équations calculées grâce à logiciel Microsoft Excel version 2007 sont les suivantes où le R^2 représente le coefficient de corrélation :

$$a_w=0.90 \text{ (■)} : y = -0,7234x - 0,1752 \quad R^2 = 0,8492$$

$$a_w=0.92 \text{ (◆)} : y = -0,8124x + 0,035 \quad R^2 = 0,8605$$

$$a_w=0.94 \text{ (▲)} : y = -0,9493x - 0,2839 \quad R^2 = 0,8144$$

$a_w=0.96$ (●) : $y = -0,8244x - 0,1341$ $R^2 = 0,8778$

La figure 12 montre les courbes de survie d'*E.coli* ATCC 25922 dans le tampon McIlvaine pH7.0 à des activités d'eau différentes.

Les deux courbes d' $a_w=0.92$ et d' $a_w=0.94$ sont presque parallèles, sachant que le temps nécessaire pour inactiver 5 cycles logarithmiques d'*E.coli* ATCC 25922 à $a_w=0.94$ est deux fois supérieure à celui de l' $a_w=0.92$ ($D_{a_w0.94}=2.35\text{min} > D_{a_w0.92}=1.91\text{min}$). Par contre l'inactivation à $a_w=0.96$ atteint à 1.92 min, donc le traitement le plus efficace est le traitement réalisé à $a_w=0.90$ où la valeur de temps de réduction décimale est la plus courte ($D_{a_w0.90}=1.73$ min).

On peut conclure qu'il y'a une relation entre l' a_w avec la valeur D, si l' a_w diminue (de 0.96 à 0.90) la valeur D diminue (de 1.92 min à 1.73 min) dans les conditions de notre expérience (à pH neutre, à température 60°C, et dans les valeurs d' a_w testées), donc on peut inactiver les cycles logarithmiques d'*E. coli* dans le tampon McIlvaine pH7.0.

✂ Comparaison de traitement thermique combiné à a_w entre le tampon McIlvaine pH4.0 et pH7.0 :

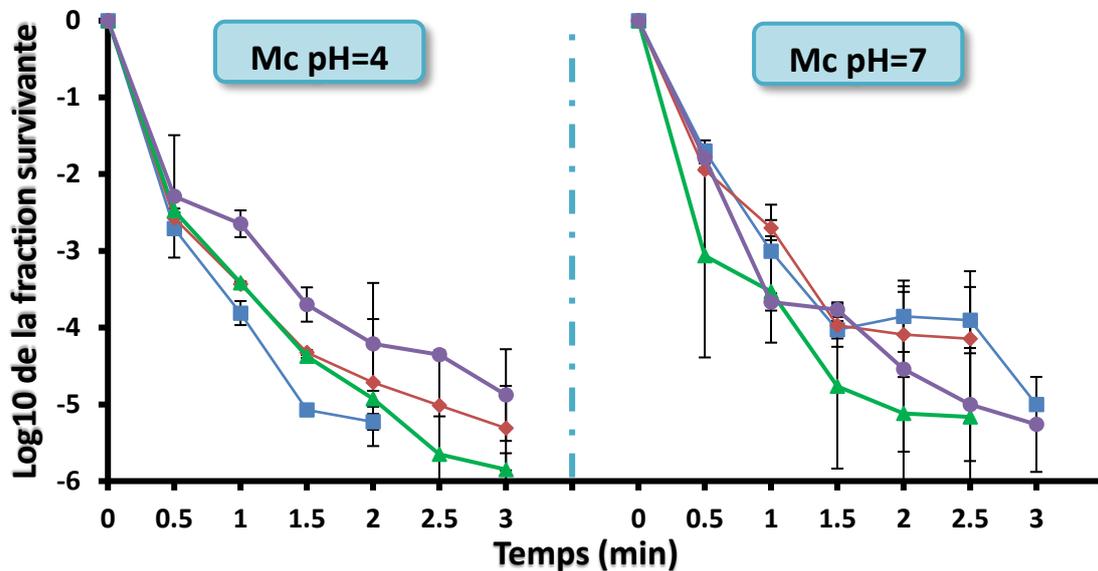


Figure 13. Graphe récapitulatif représente les courbes d'inactivation d'*E.coli* ATCC 25922 (10^7 UFC/ml) inoculée dans McIlvaine pH4 et pH7 à différentes activité d'eau ($a_w=0.90$ (■) ; $a_w=0.92$ (◆) ; $a_w=0.94$ (▲) ; $a_w=0.96$ (●)) en fonction de temps. Les données représentent les moyennes \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

Selon la **figure 13** et le **tableau IX** on trouve que le taux d'inactivation d'*E. coli* est plus élevé dans le milieu McIlvaine à pH4.0 que celle à pH7.0. Il existe une différence dans la vitesse d'inactivation d'*E. coli* ATCC 25922, où elle est un peu rapide dans le milieu acide que neutre. L'augmentation de taux d'inactivation a été notée lors de la diminution de pH du milieu et l' a_w . En général, la réduction du nombre d'*E. coli* est plus grande à un pH faible (**Ji Yeon et al., 2015**). Il y'a également eu des enquêtes de recherche sur l'effet synergique de faible pH et le traitement thermique (**Ama et al., 1994; Seo et al., 2012**). La combinaison entre la température et le pH faible augmente la destruction de la population d'*E.coli*. Dans les combinaisons synergiques de deux obstacles, l'effet global d'inactivation dépasse la somme de l'inactivation réalisée par chacun agissant seul (**Leistner et Gorris., 1995**).

La température est le facteur clé qui contrôle la survie / inactivation des bactéries. Néanmoins, d'autres facteurs défavorables tels que les faibles valeurs de pH et la réduction de l'activité de l'eau influencent la réponse microbienne. L'étude des effets principaux et combinés de la température, de l'activité de l'eau et du pH sur les paramètres cinétiques est importante pour une évaluation et un contrôle complets des processus. Plusieurs auteurs ont étudié l'influence de ces effets sur le comportement microbien (**Maria M.Gil et al., 2016**).

Les aliments à basse activité d'eau sont généralement considérés comme microbiologiquement sûrs (**Ravi Kiran Tadapaneni et al., 2017**). Des études approfondies sur les propriétés et les réactions chez les aliments ont démontré les limites du contenu de l'eau pour prédire la stabilité alimentaire. Dans les années 1950, le concept de l' a_w a été introduit par William James Scott pour montrer comment les microorganismes ont une valeur limitante (seuil) d' a_w pour la croissance. la réalisation de valeurs d' a_w inférieures à 0,5 est essentielle pour la suppression de la croissance microbienne et pour des taux réduits de réactions chimiques, y compris l'inhibition des activités enzymatiques (**Paola Pittia et al., 2016**).

Donc on peut déduire que l'inactivation d'*E. coli* ($a_w=0.953$) dans un milieu neutre à a_w élevé ou voisine de cette valeur est un peu difficile que dans un milieu acide parce qu'elle ne résiste pas dans ce dernier et elle considère le milieu à pH7.0 comme milieu favorable.

Par conséquent, on peut conclure que la faible activité de l'eau est protectrice dans la plage de température considérée et qu'une diminution du pH entraîne une diminution de la tolérance microbienne aux traitements thermiques. Ce type de réponses microbiennes est

généralement mentionné dans la littérature. L'impact du pH est moins évident à des températures plus élevées. (Maria M.Gil et al., 2016).

Tableau X : Les valeurs z (°C) calculée pour la bactérie *E.coli* ATCC 25922 après un traitement thermique combiné à a_w dans un tampon de McIlvaine à pH4.0 et à pH7.0.

Milieu de traitement	Valeurs z (°C)
Tampon McIlvaine à pH4.0	0,3004364
Tampon McIlvaine à pH7.0	-0,88808591

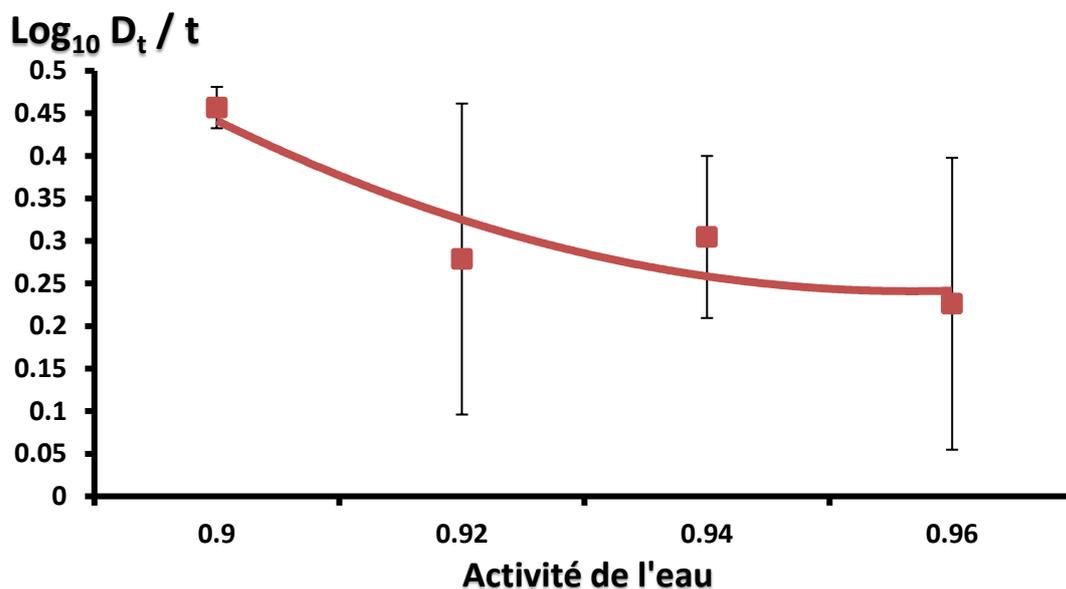


Figure 14. La courbe de temps de réduction décimale d'*E. coli* ATCC 25922 traité dans un tampon McIlvaine à pH4.0. Les données représentent la moyenne \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

L'équation calculée grâce à logiciel Microsoft Excel version 2007 est la suivante où le R^2 représente le coefficient de corrélation : $y = 0,0249x^2 - 0,191x + 0,6074$; $R^2 = 0,8383$

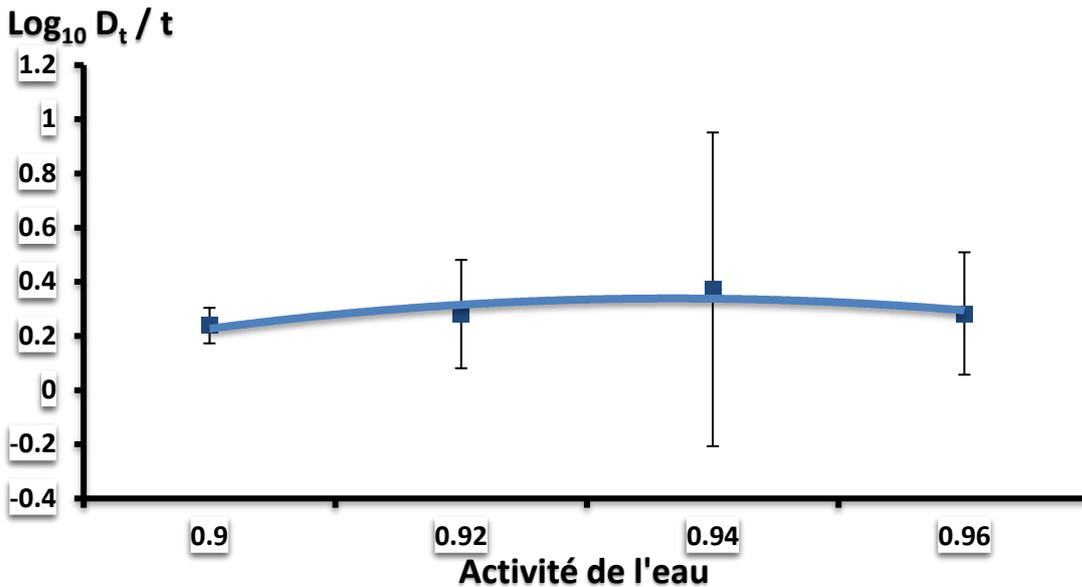


Figure 15. La courbe de temps de réduction décimale d'*E. coli* ATCC 25922 traité dans un tampon McIlvaine à pH7.0. Les données représentent la moyenne \pm écarts type (barre d'erreur) de deux expériences indépendantes.

L'équation calculée grâce à logiciel Microsoft Excel version 2007 est la suivante où le R^2 représente le coefficient de corrélation : $y = -0,0329x^2 + 0,1871x + 0,0726$; $R^2 = 0,7245$

Le paramètre z correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la durée de réduction décimale.

D'après les figures 14 et 15 et selon le tableau X on note qu'il y'a une diminution de la fraction de survivant d'*E. coli* ATCC 25922 avec la diminution de l' a_w de milieu où la vitesse d'inactivation est un peu rapide dans le tampon McIlvaine à pH4.0 que le tampon McIlvaine à pH7.0. En plus, le pH neutre favorise la survie de l'*E. coli* dans le milieu, par contre au pH acide (tampon McIlvaine à pH4.0) le taux d'inactivation est augmenté. La réduction du nombre d'*E. coli* est plus grande à un pH faible (Ji Yeon et al., 2015).

En général, on a trouvé qu'à chaque a_w étudiée il y'a une légère résistance d'*E. coli* en phase stationnaire de croissance à pH7.0 que à pH4.0. Alors le pH joue un rôle primordial dans l'inactivation d'*E.coli* ATCC 25922 dans la gamme des activités d'eau choisis dans notre étude et dans les milieux utilisés. Les obstacles les plus importants utilisés dans la conservation des aliments, en plus d' a_w , comprennent la température (élevée ou faible), l'acidité (pH), le potentiel redox et les conservateurs (Paola Pittia et al., 2016).



Conclusion générale

Conclusion générale:

Nous rappelons que les objectifs de ce travail sont d'étudier l'effet de l'activité de l'eau sur l'inactivation d'*E.coli* à température ambiante et en combinaison avec le traitement thermique à 60°C et le pH afin de préserver les propriétés organoleptiques, nutritionnelles des aliments et d'assurer la sécurité sanitaire de ces produits.

Suivant nos résultats, nous pouvons prédire que:

L'activité de l'eau est un paramètre très important pour l'inhibition des bactéries pathogènes présentes dans le milieu. Malgré les résultats obtenus à température ambiante (inactivation d'un cycle logarithmique de la population initiale d'*E. coli*), mais ce paramètre améliore son efficacité lorsqu'il est couplé avec un traitement thermique et une modification du pH de milieu de traitement, qui a montré des effets létaux et nous a permis d'inactiver 5 cycles logarithmiques de cette population microbienne.

Cette combinaison d'activité d'eau avec les techniques alternatives de conservation des aliments tels que les traitement thermiques à 60°C et le pH permet de réduire l'intensité des traitements thermiques, par conséquent d'économiser l'énergie et d'éviter les changements organoleptiques défavorables des aliments.

Notre étude confirme l'efficacité de l'activité de l'eau sur l'inactivation d'*E.coli*, et montre l'effet des autres facteurs environnementaux (le traitement thermiques, le pH) sur elle.

Elle ouvre des perspectives futures Concernant:

La combinaison entre l'activité de l'eau avec d'autres méthodes alternatives de conservation des produits, afin de préserver leurs caractéristiques.

L'étude de mécanisme d'action de l'activité de l'eau au niveau de structure bactérienne, et comment la bactérie développe les moyens de résistances et à quelle niveau.

A black scroll-shaped banner with white text. The banner has a white outline and is styled to look like a rolled-up scroll, with the top and bottom edges curving inward. The text is centered within the banner.

Références bibliographiques

A

Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Frierich, A.W., et Karch, H. (2001). *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurized milk. *Euro. Surveill.* **6**: 147– 151.

Ama, A. A., Hamdy, M. K., & Toledo, R. T. (1994). Effects of heating, pH and thermoradiation on inactivation of *Vibrio vulnificus*. *Food Microbiology*, **11**, 215-227.

Andrade, J.R., Da Veiga, V.F., De Santa Rosa, M.R. et Suassuna, I. (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **28**: 49-57.

Aqualab. (2017). Microbial growth in controlled by water activity [En ligne] <http://www.aqualab.com/applications/microbial-growth/> (page consultée le 27 janvier 2017 à 22h36).

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). [En ligne] <http://www.aoac.org/> .In : Nguyen Thu Ha. (2015). Etude expérimentale et modélisation du procédé de séchage des végétaux. Thèse de doctorat. Génie des procédés. Université de Bretagne Sud. pp 86

Avril J.-L., Dabernat H, Denis F, Montiel H.,1992 :Bactériologie clinique, 2^{ème} Edition, Edition Marketing, Paris. p 152

B

Biljana Mihajlovic., Brent Dixon., Hélène Couture., Jeff Farber. (2013). Évaluation Qualitative des Risques Microbiologiques que Comportent les jus non Pasteurisés de Pomme et D'autres Fruits, *Revue internationale d'analyse des risques alimentaires*.

Bimbenet JJ, et Loncin M. (1995). *Base du genie des procedes alimentaires*, masson, Paris, 304pp. [En ligne] http://www.memoireonline.com/02/08/940/approche-physico-chimique-pouvoir-conservateur-sel-pseudotolithus-senegalensis.html#_Toc189316179 (page consultée le 15/02/2017 à 00h15)

Blackburn.W. (2006). Food spoilage microorganism. Woodhead publishing in food science, technology and nutrition, Cambridge, England, 712 pages, (p119).

Branger Alain., Richer Marie-Madeleine., Roustel Sébastien. (2007). Microbiochimie et alimentation, Edition Educagri, *Dijon*, pp 77-78.

Breuer, T., Benkel, D. H., Shapiro, R. L., Hall, W. N., Winnett, M. M., Linn, M. J., Neimann, J., Barrett, T. J., Dietrich, S., Downes, F. P., Toney, D. M., Pearson, J. L., Rolka, H., Slutsker, L., et Griffin, P. M. (2001). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:977-982.

C

Carbonel X. (2007). Problématique de la sécurité des aliments en phase de création d'une chaîne de restauration rapide, thèse de doctorat vétérinaire. École Nationale Veterinaire d'Alfort.

CDC. 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly* **49**:911-913

Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, J., et Crick, E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol. Infect.* **111**:439-47.

Charles Alais., Guy Linden., Laurent Miclo. (2008). Biochimie alimentaire, 6^{ème} édition de l'abrégé, Dunod, pp 52,53.

Cowden, J., S. Ahmed, M., Donaghy, et A. Riley. (2001). Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol. Infect.* **26**:335-341.

D

De Mendoza, D., A. Klages-Ulrich et J. E. Cronan Jr. (1983). Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of yfr-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase. *Int. J. Biol. Chem.* **258**:2098-2101.

Djelouat S. (2008). Les Entérobactéries : généralité. Laboratoire d'analyse médicale bactériologique. Version 6. 32-43.

Ducluzeau R. (2006). Des Bactéries Génotoxiques Dans Le Tube Digestif. *Inra Prod. La Vie*, 3p. In : Guitarni Hassina, 2007. Etude de l'effet des bacteries lactiques sur l'inhibition des bacteries impliquées dans la physiopathologie digestive *in vitro*. Memoire de Magister en sciences alimentaires. Universite Hassiba Ben Bouali. Chlef.

Dupin Henri., Jean-Louis Cuq., Marie-Irène Malewiak., Catherine Leynaud-Rouaud., Anne-Marie Berthier. (1992). Alimentation et nutrition humaines. ESF éditeur,Paris. 1533 pages, pp 1221-1222,1275-1277.

E

Eberlin T ., (1997) : Les infections microbiennes : agents infectieux , volume 1, Tome 1,Nathan,128p .

EcL, (2004). Le laboratoire d'*Escherichia coli*. Université de Montréal.[En ligne] <http://www.ecl-lab.com/fr/ecoli/index.asp> (la page consultée le 16/05/2017 à 14h06)

Etournaud. A. (1999). Chimie des denrées alimentaires.Les composants des denrées alimentaire,eau. pp 5, 7, 8. [En ligne] <http://www.epsic.ch/branches/chimie/denrees/> (page consulté le 20/03/2017 à 23 :19)

F

FARKAS, J. (2007). Physical methods of food preservation .In Food microbiology: fundamentals and frontiers, pp-712.

Fauchère, J.L., et Avril, J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing S.A. :237-239. In : Mohammed Salih BARKA, 2012. Recherche et Caractérisation d'*Escherichia coli* Entérohémorragique O157:H7 dans les viandes bovines importées en Algérie. Thèse de Doctorat en Microbiologie.Université d'Oran.

Food Safety bulletin. (1997). Water activity of sucrose and Na Cl Solutions .

Food and Drug Administration (FDA). (2016) : Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Human Food: Guidance for Industry Draft Guidance. Chapter 4: Preventive Controls, pp 100-101.

G

- Garcia, M.I., et Le Bougubnec, C. (1996).** Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*, Bull. Inst. Pasteur **94**: 201-236.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., et Lilburn, T.G.(2004).** Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2nd edition.
- Garwin, J. L. et J. E. Cronan Jr. (1980).** Thermal modulation of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* does not involve *de novo* synthesis. J. Bacteriol. **141**:1457-1459.
- Ghebru, H. (1988).** Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise en sciences vétérinaires en microbiologie immunologie, Nantes. In : Mohammed Salih BARKA, 2012. Recherche et Caractérisation d'*Escherichia coli* Entérohémorragique O157:H7 dans les viandes bovines importées en Algérie. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université d'Oran.
- Greathouse, J. S., et G. M. Thorne. (1994).** Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. **32**:1172-1178.
- Gonthier, A., Guerin-Fauble, V., Tilly, B., and Delignette-Muller, M.L. (2001)** Optimal growth temperature of O157 and non-O157 *Escherichia coli* strains. Lett Appl Microbiol **33**: 352-356.
- Gonzalo Miranda., Angel Berna., Antoni Femenia., José Fernández-Salguero., Antonio Mulet. (2011).** Détermination des isothermes de sorption de l'eau des abricots et raisins. *Revue de génie industriel*, **6**, 33-40.
- Guechi, Z. (2002).** Microbiologie des viandes et des produits carnés. Cours nationales d'hygiène et de microbiologie des aliments. *Institut Pasteur d'Algérie*. **38**:140-145. In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactobacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Guiraud J.P.(1998). Microbiologie alimentaire. Ed : Dunod, Paris, pp : 88-89. In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp.et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

H

Hassani,M., Álvarez,I., Raso,J., Condon,S., Pagan,R. (2005). Comparing predicting models for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeroginosa* at different pH. International Journal of Food Microbiology 100,213-222

Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Riimnele et W. Boos. (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationnary phase thermotolerance in Escherichia coli. J. Bacteriol. 173:7918-7924.

Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M. A., Farrar, J. A., Glynn, M. K., et 72

Slutsker, L.(1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch. Intern. Med.* **159**:1758-1764.

Huang, D.B., Mohanty, A., DuPont, H.L., Okhuysen, P.C., et Chiang, T. (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli* , *J. Med.Microbiol.* 55.1303-1311.

J

Ji-Yeon Lee., Sang-Soon Kim., Dong-Hyun Kang. (2015). Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *Lwt - Food Science And Technology* 62, 83-88.

Joly B. and Alain R. (2003). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. *Ed : Lavoisier, Paris, 356 : 29-38.*In : In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp.et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Jones, P. G. et M. Inouye. (1996). RbfA, a 30Sribosomalbinding factor, isacold- shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* 21:1207-1218.

Jeantet R., Croguennec T., Schuch P. Et Brulé G., (2006). *Science des aliments : biochimie-microbiologie-procédés-produits, vol 1 : stabilisation biologique et physico-chimique*, tech & doc, paris, 383 pp.

[En ligne] http://www.memoireonline.com/02/08/940/approche-physico-chimique-pouvoir-conservateur-sel-pseudotolithus-senegalensis.html#_Toc189316179 (page consultée le 15/02/2017 à 00h15)

Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J.B., Welch, M.K., Khakhria, R. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol. Infect.* **120**: 17-20.

Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., et Kaper, J.B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 7839-7843.

K

Kandror, O., A. De Leon et A.L.Goldberg. (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**:9727-9732.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., et Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.

Karch H., Tarr P.I. and Bielaszewska M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* **295**: 405-418.

Karmali, MA. (1989). Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.Rev.* **2** :15-38.

Katsui,N., T.Tsuchido, M. Takano et I.Shibasaki. (1981). Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions. *J. Gen.Microbiol.***122**:357-361.

Katzin, L. I., Sandholzer , A.& M., S. (1942). Application of the decimal reduction time Principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization . *Journal of Bacteriology* **45** , 265-272.

Kauffmann, F. (1947). The serology of the *E. coli* group. *J. Immun.* **57**: 71-100. In : Mohammed Salih Barka, 2012. Recherche et Caractérisation d'*Escherichia coli* Entérohémorragique O157:H7 dans les viandes bovines importées en Algérie. Thèse pour de Doctorat en Microbiologie. Université d'Oran.

Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams Jr, L.P., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., et Fleming, D.W. (1994). A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *New England Journal of Medicine.* 331: 579- 584.

L

Lang Emilie. (2016). Compréhension de l'inactivation de bactéries pathogènes présentes dans des produits alimentaires déshydratés. Ingénierie des aliments. Université de bourgogne. Français.p.30,

Larpent J.P. (1997). Les bactéries lactiques. *In* : Microbiologie alimentaire,Aliments fermentés et fermentations alimentaires (Tome 2), 2e édition, (eds Bourgeois C.M. et Larpent J.P.), Lavoisier, Tec. & Doc., Paris. pp. 6-33. In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp.et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Laskin, A. et Lechevalier, H. (1994). Handbook of microbiology. 2' edition. Vol. 1.CRC Press. Ohio. p. 1-15

LeBlanc J.J.(2003). Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 29: 277-296.

Leclerc H., Gaillard J.L. and Simonet M. (1995). Microbiologie générale : La bactérie et la monde bactérien. *Ed : Doin, Paris.* In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp.et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia, p35.

Leistner,L., Gorris,L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science&Technology* 6,41-46.

LEMAUX, P.G., S.L. Herendeen, P. L. Blochet, F. C. Neidhardt. (1978). Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell*. 13:427-434.

Le Minor, L., Popoff, M.Y., et Bockemuhl, J. (1990). Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 141: 1173-1177

Le Minor L. and Richard C. (1993). Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut Pasteur, Paris, 310-324. In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-389 .

Levy Caroline. (2010). Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires. Ecole Doctorale. Science agricoles. Université d'Avignon. Français. 192 pages, p.8.

L'organisation mondiale de santé (OMS). (2016). *Escherichia coli (E. coli)*. Aide-mémoire N°125. [En ligne] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/fr/> (page consultée le 14/4/2017 à 17h30).

Lund, B. M., Baird-Parker, T.C. & Gould, G. W. (2000). The microbiological safety and quality of food. *J. Food Prot.* 54 :762-766.

M

Marchal N., Bourdon J. and Richard C. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*. p. 65-149. In : In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Maria M. Gil, Fátima A. Miller, Teresa R. S. Brandão, Cristina L. M. Silva., (2016). Combined effects of temperature, pH and water activity on predictive ability of microbial kinetic inactivation model, 9th International Conference on Predictive Modelling in Food, *Procedia Food Science* 7, 67 – 70

Marc Henry. (2014). Activité de l'eau.

[En ligne] <https://prmarchenry.blogspot.com/2014/07/activite-de-leau.html> (page consultée le 27/1/2017 à 18h34)

Mao Y., Zhu C. and Boedeker E.C. (2003). Foodborne enteric infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 19:11-22.

Mcswane D., Rue N. , Linton ,R. (2000). Essentials food safety and sanitation. New Jersey: Prentice Hall Inc.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., et Yanagawa, H. (1999). Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150:787-796.

Milley, L.G.et L.H.Sekla. (1993). Anenzyme –like immunosorbent assay- isolation procedure for vero toxin in *Escherichia coli* O157:H7. *J.Bacteriol.* 177:3004-3009.

Molbak K., Mead P.S. and Griffin PM. (2002). Antimicrobial therapy in patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection. *JAMA.* 288: 1014-1016.

Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B., et Majid, F.1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 111: 181-187.

Morgan, G. M., Newman, C., Palmer, S. R., Allen, J. B., Shepherd, W., Rampling, A. M.,

Warren, R. E., Gross, R. J., Scotland, S. M.,et Smith; H. R. (1988). First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect.* 101:83-91

N

Nafti Yahia., (2011). Biochimie alimentaire, Polycopié, Biologie Option Contrôle de Qualité et Analyse (C.Q.A). Université de Djelfa, 59 pages, pp 6,8,9.

Nataro J.P, and Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201. In : Mohammed Salih BARKA, 2012. Recherche et Caractérisation d'*Escherichia coli* Entérohémorragique O157:H7 dans les viandes bovines importées en Algérie. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université d'Oran.

Nauciel C. (2000) : Bactériologie médicale . Masson .Paris. 276 pages,pp.129

Nauta, M.J. and Dufrenne, J. (1999). Variability in growth characteristics of different *E. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quantitative Microbiology* 1, 137-155.

Nganguem Marthe., (2007). Approche physico-chimique du pouvoir conservateur du sel : cas du salage de *Pseudotolithus senegalensis* .Thèse de maitrise professionnelle de biotechnologie dans IAA. Université d'Abomey-Calavi.

[En ligne] http://www.memoireonline.com/02/08/940/approche-physico-chimique-pouvoir-conservateur-sel-pseudotolithus-senegalensis.html#_Toc189316179 (page consultée le 15/02/2017 à 00h15)

Nguyen Tuan Anh. (2014). Approches expérimentales et numériques pour l'étude des transferts hygroscopiques dans le bois. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges. Discipline : Génie Civil, p12.

Nguyen Thu Ha. (2015). Etude expérimentale et modélisation du procédé de séchage des végétaux. Thèse de doctorat. Génie des procédés. Université de Bretagne Sud. pp 85-86,189.

Nsren Albitar. (2010). Etude comparative des procédés de séchage couplés à la texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC, en termes de cinétique et de qualité nutritionnelle. Applications à la valorisation des déchets agro-industriels. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de L'Université de La Rochelle. Discipline: Génie des Procédés Industriels, pp 52.

P

Panos G.Z., Betsi G.I. and Falagas M.E.(2006). Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment Pharmacol Ther.* 24: 731-742.

Paola Pittia., Paparella Antonello., (2016). Safety by control of water activity: drying, smoking, and salt or sugar addition, chapter 2, faculty of Bioscience and Technology for Food Agriculture and Environment, University of Teramo (Italy).

Pascal Dhulster. (2015). **Le séchage**, Université de Lille, sciences et technologies. [En ligne] http://tech-alim.univ-lille1.fr/sechage/co/Chapitre1_1.html (page consultée le 25/03/2017 à 01h09)

Pasteur P. (1981). Milieux de culture au laboratoire. *Edition Pasteur* p : 44-49. In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp.et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Philippe Robichaud-Rincon. (2012). Impact des stress environnementaux et thermiques sur l'efficacité des systèmes antimicrobiens chez *Escherichia coli* :Approches transcriptomiques. Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie agroalimentaire pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc).pp 5-6,9-11.

Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N. and Balbastre C. (1981). Bactériologie médicale et vétérinaire. biologie appliquée. ISBN 2-7040-0362-9. In : Bey Faiza, 2009. Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp.et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister en Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia.

Pohl, P. (1993). Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *An. Méd.Vété.* 137:325-333. In : Mohammed Salih BARKA, 2012. Recherche et Caractérisation d'*Escherichia coli* Entérohémorragique O157:H7 dans les viandes bovines importées en Algérie. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université d'Oran.

Prescott., Harley., Lein., Wiley., Sherwood., Woolverton, (2010). Microbiologie, 3^e édition de Boeck Université de France, 154-155.

R

Ravi Kiran Tadapaneni, Roopesh M. Syamaladevi, Rossana R. Villa, Juming Tang., (2017). Design of a novel test cell to study the influence of water activity on the thermal resistance of Salmonella in low-moisture foods, Journal of Food Engineering.

Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E.S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., et Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.

Rodrigue. D.C., Mast, E.E., Greene, K.D., Davis, J.P., Hutchinson, M.A., Wells, J.G., Barrett, T.J., Griffin, P.A. 1995. A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J. Infect. Dis.* 172:1122–5.

Rotronic. (2013). L'activité de l'eau. Mesure de l'activité de l'eau. pp 3.

Rousset Elodie, J. Daniel Dubreuil. (2000): Les récepteurs des enterotoxines bactériennes. Veterinary Research, BioMed Central, 31 (4), pp.413-435.

Russell, N. (1990). Cold adaptation of microorganisms. Phil. Trans. R. Soc, Londre, UK. 436:595-611.

S

Savoie Fanny. (2011). Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne. Discipline : Sciences de la vie. Spécialité : Microbiologie. pp5, 16.

Schuck Pierre, Dolivet Anne, Jeantet Romain. (2012). les poudres laitières et alimentaires. Techniques d'analyse, éditions Lavoisier, Paris .pp 1

Seo, K., Lee, J. E., Lim, M. Y., & Ko, G. (2012). Effect of temperature, pH, and NaCl on the inactivation kinetics of murine norovirus. Journal of Food Protection, 75, 533-540.

Strôm, A. R. et I. Klaasen. (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress Protection, and stress regulation of gene expression. Mol. Microbiol. 8:205-210.

T

Thomas Ryan. (2003). L'activité de l'eau une autre façon de voir l'humidité. p 41.

Troller J. A., d. T. Bernard, and v. W. Scott. (1984). measurement of water activity. In: compendium of methods for the microbiological examination of foods. American public health association, washington, dc, pp.124–134. United States Pharmacopoeia (USP) Method<1112>application of water activity determination to non sterile pharmaceutical products. [en ligne]

http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1112.html
(page consultée le 26/01/2017 à 14 :09)

U

USFDA, The Bad Bug Book. (1997). Water activity of sucrose and NaCl solutions in food safety bulletin.

V

Vallerian S. (1999). Contribution à l'étude de la maîtrise de la qualité hygiénique dans la restauration rapide .Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse.

W

Welsh. D.T.et R.A.Herbert. (1999). Osmotically induced intra cellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **174**:57-63.

Willshaw, G.A., Smith, H.R., Roberts, D., Thirdwell, J., Cheasty, T., et Rowe, B. (1993). Examination of raw beef products for the presence of Verotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**: 420-426.

Z

ZANONI, B., C. Peri, C. Garzaroli et S. Pieracci. (1993) .A dynamic mathematical model of the thermal inactivation of *Enterococcus faecium* during Bologna sausage cooking. LWT-Food Science & Technology. **30**:727-734.



Annexes

Annexe 1 : Composition des principaux milieux de culture utilisés➤ **Milieux liquides**♣ **Tryptic Soy Broth (TSB)**

Composition en g/l :

Tryptone.....	17g.
Peptone de soja.....	03g.
Glucose.....	2,5g.
NaCl.....	05g.
Phosphate di-potassique.	2,5g.
Extrait de levure.....	0,6%.

pH= 7,3±0,2, Stérilisation à 121°C/15min.

♣ **Eau physiologique stérile :**

Composition en g/l :

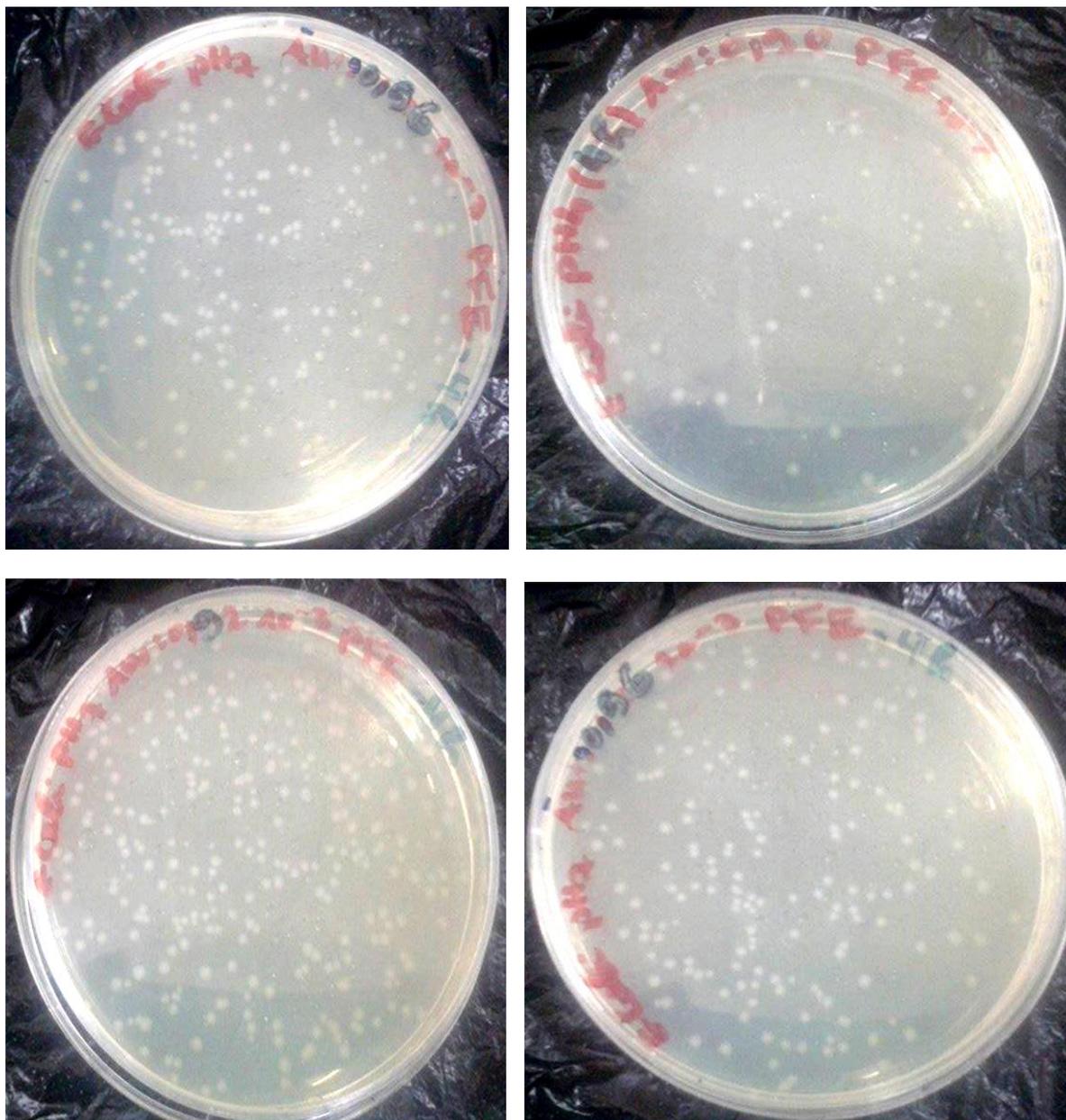
Chlorure de sodium (NaCl).....	09g.
Eau distillée.	11.

pH= 7, Stérilisation à 121°C/15min.

➤ **Milieu solide**♣ **Tryptic Soy Agar (TSA)**

Composition en g/l :

Agar	20g.
Peptone de soja.....	05g.
Peptone de caséine.....	15g.
Extrait de levure	0.6%



Annexes 2 : Images montrent la croissance d'*E.coli* sur le gélose TSA-YE à différentes aw (à pH4 et pH7) après l'incubation à 37°C pendant 24 heures

Annexes 3 : les appareils utilisés



Un agitateur vortex



Un étuve



Un autoclave



Un pH mètre



Centrifugeuse de type Sigma



Un compteur des colonies