

Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach - Alger
Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de **Magister** en **Sciences Agronomiques**
Option : Alimentation et Nutrition
Département : Technologie des Industries Agroalimentaires

***Inactivation par rayonnements ultraviolets
de Staphylococcus aureus (ATCC
6538), Escherichia coli (ATCC 25922) et
Pseudomonas aeruginosa(ATCC 9027)
inoculés dans du lait écrémé***

Melle ATTAL Fella-Sara

Promoteur: Dr AMIALI M.

Soutenu le : 08/12/2013

Jury: **Président** : Pr. BENCHABANE A. Examineurs : Pr FERHAT Z. Pr SIBOUKEUR O.E.K

Table des matières

résumé . .	5
abstract . .	6
ص-خلم . .	7
Dédicace . .	8
remerciements . .	9
liste des abreviations . .	10
Avant-propos . .	11
Introduction . .	12
Chapitre I : les traitements de conservation . .	14
I.1 Les traitements thermiques . .	14
I.1.1 Principe . .	14
I.1.2 Mécanismes d'inactivation des microorganismes . .	15
I.1.3 Efficacité microbiologique du traitement thermique . .	15
I.1.4 Equipements industriels . .	16
I.1.5 Avantages du traitement thermique, limites, produits cibles . .	17
I.2 Techniques non thermiques alternatives . .	18
I.2.1 Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) et Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone (HPDC) . .	18
I.2.2 Champs électriques pulsés (CEP) . .	22
I.2.3 Irradiations . .	25
I.2.4 La lumière pulsée . .	28
I.2.5 UV continus . .	31
I.2.6 L'étude approfondie du traitement aux UV présente-t-elle un réel intérêt par rapport aux autres techniques physiques de décontamination ? . .	33
Chapitre II : les rayons Ultraviolets . .	34
II.1 Présentation des rayons Ultraviolets . .	34
II.1.1 Historique . .	34
II.1.2 Définitions . .	34
II.2 Actions générales des UV . .	36
II.2.1 Actions cellulaires . .	36
II.2.2 Actions sur les acides nucléiques . .	37
II.2.3 Réparation cellulaire . .	39
II.2.4 Paramètres influençant l'action des UV . .	40
II.2.5 Avantages et inconvénients des UV . .	42
II.3 Action des microorganismes . .	43
II.3.1 Notion de dose létale (D10) . .	43
II.3.2 Sensibilité des microorganismes . .	43
II.4 Mode d'émission des UV . .	45
II.4.1 Techniques . .	45
II.4.2 Sources d'émission des UV . .	46
II.4.3 Installation de traitement UV . .	48

II.5 Applications dans les industries agro-alimentaires . .	51
II.5.1 L'air . .	51
II.5.2 Applications aux liquides . .	52
II.5.3 Applications aux surfaces et aux solides . .	54
Chapitre III : Matériel et méthodes . .	56
III.1 Préparation du lait . .	56
III.2 Cultures testées . .	56
III.3 Traitements UV-C . .	58
III.4 Opérations effectuées . .	61
III.5 Traitement des données . .	65
chapitre IV : Résultats et discussion . .	67
IV.1 courbes de survie . .	67
IV.1.1 Milieu général: PCA . .	67
IV.1.2 Milieu spécifique . .	74
IV.2 courbes d'inactivation . .	80
IV.2.1 Staphylococcus aureus . .	81
IV.2.2 Escherichia coli . .	82
IV.2.3 Pseudomonas aeruginosa . .	83
IV.2.4 Comparaison des courbes d'inactivation des trois bactéries . .	85
CONCLUSION . .	87
Références bibliographiques . .	88

résumé

La technologie de traitement du lait par les rayonnements UV-C est une méthode innovante et émergente de pasteurisation à froid. Notre travail a porté sur l'efficacité des UV-C sur l'inactivation de quelques espèces bactériennes à savoir ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 9027), inoculées dans du lait totalement écrémé (0.1% MG). La chambre de traitement est en acier inoxydable, munie de 3 lampes UV-C montées en série. Le traitement a été effectué à différentes hauteurs : 5, 15, 25 et 45cm ; à des temps allant de 5 à 15 minutes et à une température ambiante de 26.5 ± 2 °C. Les différents traitements ont abouti à des inactivations bactériennes moyennes de 1,8 , 1,95 et 2,05log de réduction respectivement pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière est l'espèce la plus sensible au traitement, suivie d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. En conséquence, le traitement du lait aux ultraviolets apparaît comme une technique prometteuse à développer et/ou à utiliser en combinaison avec les traitements du lait par la chaleur. Les combinaisons de traitement (UVs/chaleurs) des aliments thermosensibles comme le lait permettent de réduire considérablement les températures utilisées dans les techniques conventionnelles de pasteurisation à la de chaleur. De ce fait, les qualités nutritionnelles et organoleptiques du lait

seront préservées d'une part et l'énergie utilisée durant le traitement sera réduite d'autre part.

Mots Clés : *Staphylococcus aureus* -*Escherichia coli* - *Pseudomonas aeruginosa* - Lait - Ultraviolets - Inactivation - Traitement athermique.

abstract

The UV-C technology of milk treatment is an innovative and emerging method of nonthermal pasteurization. Our study showed the effectiveness of UV-C irradiation of the inactivation of bacterial cultures of 3 strains; *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), inoculated in skim milk (0,1 % fat). The treatment chamber was made in stainless steel and provided with 3 UV-C. The treatment was carried out at different distances from the light source: 5, 15, 25 et 45cm at several periods (from 5 up to 15 minutes) and average ambient temperature of 26.5 ± 2 °C. The different treatments reached for the 3 strains up to 1,8, 1,95 and 2,05 log reduction respectively for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, on their respective media. The latest showed to be the more sensitive to UV-C light followed by *Escherichia coli* then *Staphylococcus aureus*. Consequently, the UV-C treatment of milk appears as a promising technique to develop and improve or to combine it with conventional thermal techniques in order to reduce the temperature and energy involved and required for such methods, so as to preserve the milk qualities in on one hand and reduce the energy used in the other hand.

Key words : *Staphylococcus aureus* - *Escherichia coli* - *Pseudomonas aeruginosa* - Milk - Ultraviolet - Inactivation - Nonthermal treatment.

ص-خلم

تكنولوجيا معالجة الحليب عن طريق الأشعة فوق البنفسجية " ج " هي طريقة جديدة و في طريق الانتشار للبيطرة الباردة . الهدف من عملنا هو الكشف عن فعالية هذه الأشعة بتثبيت بعض اصناف البكتريا *Staphylococcus aureus* (6538ATCC) ، *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (9027 ATCC) مزروعة في حليب خالي من الدسم (0,1%)

غرفة المعالجة مصنوعة من معدن غير قابل للتأكسد وتحتوي على 3 مصابيح مركبة بالتسلسل. المعالجة تمت في مستويات مختلفة 25،15،5 و 45 سم في زمن يتراوح بين 5 إلى 15 دقيقة في درجة حرارة الوسط 26.5 ± 2 . المعالجات المختلفة ادت الي تثبيطات متنوعة بمعدل 1,8، 1,9، و 2,05 لبع تخفيض البكتريا التوالي *Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* ، *Pseudomonas aeruginosa*. هذه الأخيرة تمثل الصنف الأكثر حساسية للمعالجة متبوعاً بـ *Escherichia coli* ثم *Staphylococcus aureus*. بالتالي معالجة الحليب بالأشعة فوق البنفسجية عبارة عن تقنية ذات مستقبل يجب تطويرها أو إستعمالها مع تقنيات حرارية، جمع التقنيات (اشعة فوق البنفسجية/ حرارة) للمواد الغذائية الحساسة للحرارة مثل الحليب يسمح بتخفيض معتبر لدرجات الحرارة المستعملة في تقنيات المعالجة الحرارية مثل البسترة . إذا الميزات الغذائية و العضوية الذوقية للحليب سوف يحتفظ بها من جهة، و الطاقة المستعملة خلال المعالجة تخفض من جهة أخرى.

الكلمات المفتاحية :

اشعة فوق البنفسجية – تثبيت. المعالجة الحرارية.

Dédicace

To Hassina, To Abdesslam, With all my Love...

remerciments

Ce travail a été réalisé à l'Institut National Agronomique d'Alger, au Département de Technologie Alimentaire et de Nutrition Humaine.

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent, à mon directeur de mémoire, Dr **AMIALI Malek**, PhD-Ing, Maitre de Conférences Classe A à l'E.N.S.A, de m'avoir donnée l'occasion de travailler sur ce sujet, pour m'avoir mis tous les moyens à ma disposition afin de voir l'accomplissement de ce modeste travail, pour sa présence si singulière.

J'exprime ma gratitude à Pr. **BENCHABANE Ahmed**, Chef du Département de Technologie Alimentaire et de Nutrition Humaine et Professeur à l'E.N.S.A, pour m'avoir accueilli au sein de ses laboratoires et pour la gentillesse qu'il m'a témoignée tout au long de mon cursus.

Je remercie sincèrement, Pr. **FERHAT Zoulikha** de l'E.N.S.A. et Pr. **SIBOUKEUR Oum El Khir** de l'université KASDI Merbah, Ouargla, qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon jury, accepté de juger ce travail et d'en être des rapporteurs. Je leur dois une nette amélioration de la qualité de ce document. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à Monsieur **AIT ALI YAHIA Yassine**, Maitre de Conférences à l'Ecole Supérieure d'Informatique, pour son aide, son ouverture d'esprit, sa disponibilité et ses conseils avisés, qui a apporté sa touche et participé dans mon modeste mémoire.

J'écris ma reconnaissance à **Dr James LYNG** de l'Université de Dublin, **Dr Yonca YUCEER** de l'Université d'Ankara et **Dr Elisa GAYAN** de l'Université de Saragosse, pour leur aide inestimable, leurs conseils, leur temps et leur énorme gentillesse à mon égard.

Un merci particulier à mon binôme de travail, comme dans la vie, Melle **BERROUANE Nour El Houda**, pour avoir fait avec moi les premiers pas dans cette école et dans ce département, pour avoir toujours été là, envers et contre tout.

Sans oublier Melle **BELALOUI Djahida**, pour sa présence à mes côtés et à toutes épreuves, sa gentillesse, sa disponibilité et sa sollicitude sans retenue m'ont été d'un grand apport moral. Je n'oublierai pas son aide si précieuse, mon bras droit et mon ange gardien. Merci du fond du cœur.

Sincères remerciements à mes post-graduants : **LAKER Khaoula**, **AISSIOU Mohamed Yahia el Amine**, **KEDDAR Mohamed Nadir**, **BENLAHRECH Samia** et **MALIOU Djamil**, pour leur présence, leur bonne humeur, leur gentillesse, leur dévouement, et surtout leurs encouragements.

Enfin, un grand merci à **BELKESSAM Abdesslam** pour m'avoir apportée ses connaissances et contribuer dans mon travail.

liste des abreviations

Symbole	Définition	Unité
<i>ADN:</i>	acide désoxyribonucléique	
<i>ARN:</i>	acide ribonucléique	
<i>ATCC:</i>	American Type Culture Collection	
<i>CEP:</i>	Champ Electrique Pulsé	
<i>D:</i>	Dose d'UV	mW.s/cm ²
<i>E_a :</i>	Energie of activation	Joule per mole (J mol ⁻¹)
<i>FDA:</i>	Food and Drug Administration	
<i>HPDC:</i>	Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone	
<i>HPH:</i>	Hautes Pressions Hydrostatiques	
<i>I₀:</i>	Intensité incidente	joule par centimètre carré (J/cm ²)
<i>LP:</i>	Lumière Pulsée	
<i>M.G. :</i>	Matière Grasse	%
<i>P:</i>	Pression	Pascal (Pa)
<i>PCA:</i>	Plate Count Agar	
<i>R:</i>	Constante des gaz parfaits	8.31 J °/(K mol)
<i>S:</i>	Surface	centimètre carré (cm ²)
<i>t:</i>	temps de traitement	Minutes (min)
<i>T:</i>	Température	(°C or °K)
<i>U.H.T.:</i>	Ultra Haute Température	
<i>UFC:</i>	Unité Format une Colonie	
<i>UV:</i>	Ultraviolets	
<i>VRBG:</i>	Violet Red Bile Glucose	

Avant-propos

Le développement de nouveaux procédés innovants de transformation des denrées alimentaire visant à l'amélioration de l'innocuité des produits alimentaires et de prolonger leur durée de vie présente un réel intérêt pour le secteur agroalimentaire.

Dans un contexte actuel qui tend vers une responsabilisation environnementale des industries, la recherche scientifique cherche des solutions pour la conservation des produits alimentaires et la décontamination des surfaces sans ajout de produits chimiques dont la plupart cancérigènes et/ou sans consommation d'eau ni de procédés énergivores, mettant en œuvre entre autre une technologie innovante et émergente des rayons UV. Etudiée en laboratoire depuis les années 80, cette technique a manqué jusqu'à récemment de fondements scientifiques solides permettant ainsi l'obtention de résultats fiables et satisfaisants pour des applications industrielles (Levy, 2012).

La maîtrise de la technologie nécessite en particulier l'étude des phénomènes physiques qui interviennent lors du procédé, et des mécanismes microbiologiques s'y rapportant.

Introduction

La conservation des aliments est un combat constant contre les microorganismes d'altération et/ou les pathogènes de l'homme. Depuis longtemps le coût des produits, leur qualité, mais surtout l'innocuité des aliments ont été les principaux centres d'intérêt des industriels. A l'heure actuelle, la chaîne alimentaire est devenue plus complexe, multipliant les possibilités de contamination et de développement des agents pathogènes tel que *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*.... (**Codex Alimentarius, 2003**).

Les techniques de décontamination sont très étudiées et présentent un intérêt primordial dans les industries agroalimentaires au niveau mondial. D'un autre côté, il faut faire face à une demande croissante des consommateurs de produits frais, sains et satisfaisants sur le plan organoleptique, avec une durée de conservation de plus en plus longue. Nous nous sommes tournés vers une alimentation qui allie qualités gustatives et nutritionnelles. 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 (**Cullen et al ., 2012**).

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 naturel. 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, durée de vie des produits..). De nombreuses espèces microbiennes peuvent être à l'origine d'altérations des aliments ou encore de toxi-infections alimentaires. Parmi elles, les spores bactériennes telles que les spores produites par les genres *Bacillus* et *Clostridium* sont souvent le problème le plus difficile à résoudre pour la conservation. En effet, les spores sont connues comme une des formes de vie les plus résistantes et leur inactivation complète nécessite un traitement souvent sévère qui peut altérer considérablement la qualité de l'aliment traité (**Adams et Moss, 2008**).

Les traitements thermiques sont les plus utilisés en industrie agroalimentaire. Ce sont des méthodes physiques sûres et bénéficient d'une image nettement plus positive que les traitements faisant intervenir des composés chimiques. Cependant, plus études ont démontré qu'ils altèrent parfois fortement les qualités organoleptiques, nutritionnelles et fonctionnelles des aliments. De ce fait, il y a donc un réel besoin de trouver des traitements alternatifs, moins dénaturants, mais permettant la même efficacité de décontamination microbiologique (**Chen et al. , 2010**).

Parmi les technologies innovantes, les techniques dites "athermiques ou non-thermiques" présentent une alternative prometteuse. Les techniques physiques, visant à remplacer et/ou supplémer les traitements thermiques, offrent une meilleure image (préservation du naturel). Ces techniques physiques regroupent, entre autres, les hautes pressions hydrostatiques, les champs électriques pulsés, l'irradiation (Rayons X, Rayons γ), les UV continus et la lumière pulsée. Certaines d'entre elles, comme les ultraviolets (UV), sont de bons candidats pour l'utilisation en industrie, en tant que techniques athermiques de préservation des aliments (**Koutchma et al ., 2009**). De plus, il est important de connaître

les principes de ces différentes méthodes, mais également les limites qu'elles peuvent engendrer, dans le but de déterminer les applications possibles et les intérêts industriels de ces nouvelles technologies (Levy, 2012).

Afin de mieux cibler les besoins et les problèmes rencontrés dans ces techniques athermiques, il est indispensable d'avoir un certain recul sur ces traitements appliqués sur divers produits alimentaires. Les domaines d'application des techniques de décontamination des aliments sont déterminés par de multiples études expérimentales qui permettent de dégager les grands principes conditionnant leur efficacité et les aliments qui peuvent être traités avec profit pour l'industrie et pour les consommateurs (Alzamora *et al.*, 2012).

A ce titre certains procédés bénéficient d'un historique riche et d'applications validées par l'expérience de plusieurs dizaines d'années sur des volumes d'aliments plus que significatifs (Bermudez-Aguirre et Barbosa-Casnovas, 2011). Par contraste, la technique Ultraviolet est encore « jeune », connue depuis de nombreuses années mais encore peu utilisée en industrie alimentaire. Son développement technologique nécessitera par la suite un savoir partagé entre physique et microbiologie.

Le potentiel des UV a été étudié pour leur application sur le cidre de pomme, jus d'orange, dérivés d'œufs liquides, lait et miel. En effet, Schenk *et al.* (2011) ont rapporté l'efficacité des UV pour le traitement du lait écrémé, avec une inactivation d'*Escherichia coli* de 7,2 log de réduction pour 3 minutes de traitement continu alors que les travaux de Palgan *et al.* (2011) ont remarqué une réduction de 5,66 et 3,88 pour *Escherichia coli* et *Listeria innocua* respectivement, inoculés dans du jus de pomme et 0,84 et 1,06 log respectivement dans le lait entier.

Pour la technologie des Ultraviolets, de nombreuses données sont encore incomplètes par rapport à des traitements comme la pasteurisation ou l'irradiation. Mieux comprendre les caractéristiques du traitement, les facteurs d'influence, et établir des relations dose/réponse sont déterminants pour appliquer la technologie à l'industrie agroalimentaire (Chen *et al.*, 2010).

Les choix de la méthode se portent à la fois sur le type de produit à traiter, sur la décontamination attendue, ainsi que sur les contraintes imposées et le prix de revient.

Les objectifs de ce travail sont comme suit:

1. Etudier l'efficacité des rayons UV-C comme une pasteurisation athermique pour le lait ;
2. Etudier l'effet de la hauteur sur l'inactivation bactérienne
3. Déterminer la cinétique de dégradation des différentes souches bactériennes au cours du temps.
4. Développer des modèles mathématiques de cinétique de dégradation microbienne de chaque souche étudiée.

Chapitre I : les traitements de conservation

I.1 Les traitements thermiques

I.1.1 Principe

Les traitements thermiques sont aujourd'hui les techniques de décontamination les plus communément utilisées en industrie agroalimentaire. En termes de sécurité alimentaire, ils ont pour objectif de détruire ou d'inactiver totalement, d'une part les enzymes et d'autre part les microorganismes et leurs toxines, dont la présence ou la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à l'alimentation humaine (Levy, 2012).

Les premiers procédés industriels de traitement thermique datent de 1809, avec Nicolas Appert (1749-1841). Ce dernier a mis au point une méthode de conservation des aliments en les traitant par la chaleur dans des bouteilles en verre hermétiquement scellées. Mais ses travaux ne se limitent pas à la conservation; il découvre le procédé de chauffage du lait à une température proche de 70°C permettant une conservation limitée dans le temps, qu'il applique également au vin et à la bière, procédé dit maintenant «pasteurisation». Soixante ans plus tard, Louis Pasteur (1822-1895) a expliqué scientifiquement le processus et reconnaîtra en Appert un précurseur. Par la suite, il mettra au point la méthode permettant de réduire le niveau de contamination d'un milieu grâce à un chauffage de quelques minutes entre 55°C et 60°C en l'absence d'air (Mafart, 1996). Depuis cette époque de nombreuses études ont été menées sur le traitement thermique, dans le but d'optimiser les procédés pour allier le mieux possible la sécurité et la conservation des aliments. De nos jours, on utilise plusieurs procédés, selon le couple temps/température appliqué. La pasteurisation nécessite un chauffage généralement inférieur à 100°C et la stérilisation, un couplage temps/température plus élevé.

La **pasteurisation** est un traitement thermique modéré permettant la destruction des microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. La température du traitement est généralement inférieure à 100°C (62°C et 88°C) et la durée, de quelques secondes à quelques minutes. Ce traitement thermique doit être suivi d'un brusque refroidissement afin de ralentir le développement des germes encore présents (Boumendjel, 2005). Les aliments pasteurisés sont ainsi habituellement conservés au froid. En dehors de la réfrigération, d'autres moyens de conservation peuvent être utilisés parallèlement pour contrer le développement des microorganismes survivants: ajout d'agents chimiques de conservation, emballage sous vide, réduction de l'activité de l'eau (*aw*), etc. La pasteurisation reste néanmoins inefficace pour détruire les spores bactériennes, beaucoup plus résistantes à la chaleur que les cellules végétatives. La technique est spécifique au produit traité, chacun d'eux possédant un barème de pasteurisation (Mafart, 1996). La durée de conservation des aliments pasteurisés est tout de même limitée (Demirci et Ngadi, 2012).

La **stérilisation** est un traitement thermique qui a pour finalité de détruire toute forme microbienne vivante. Le traitement à ultra haute température (UHT) consiste à chauffer le produit à une température assez élevée, entre 135°C et 150°C, pendant un temps très court, de 1 à 5 secondes. Le produit stérilisé est ensuite refroidi puis conditionné aseptiquement (**Demirci et Ngadi, 2012**). Ce procédé est utilisé par exemple pour la stérilisation des produits liquides (lait, jus de fruits...) ou de consistance plus épaisse (desserts lactés, crèmes, jus de tomate, soupes...).

L'appertisation (**Appert, 1810**) consiste à stériliser par la chaleur des denrées périssables dans des contenants hermétiques (boîtes métalliques, bocaux). Sont considérées comme conserves les denrées alimentaires, d'origine animale ou végétale périssables, dont la conservation est assurée par un procédé associant le conditionnement dans un récipient étanche à l'eau, aux gaz et aux microorganismes, à toute température inférieure à 55°C et un traitement par la chaleur. L'appertisation est largement utilisée aujourd'hui pour la conservation à long terme des denrées alimentaires pouvant aller de plusieurs mois à quelques années (**Boumendjel, 2007**).

1.1.2 Mécanismes d'inactivation des microorganismes

La chaleur humide tue le microorganisme par dénaturation des acides nucléiques, des protéines de structure et des enzymes. 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 de la forte influence de l'activité de l'eau. En effet, la chaleur sèche nécessite de plus hautes températures et des temps de chauffage plus longs pour arriver au même taux de destruction. Les spores bactériennes sont, de manière générale, les plus thermorésistantes que les cellules végétatives. En effet, la spore est une structure déshydratée et la teneur en eau est directement corrélée à la thermorésistance (**Farkas, 2007**).

1.1.3 Efficacité microbiologique du traitement thermique

Le traitement thermique est caractérisé par le couple temps/température. Les premiers travaux de thermorésistance microbiologique se sont focalisés sur l'expression de la réponse des microorganismes. L'expression de la cinétique de destruction en base décimale a permis d'introduire le terme de "durée de réduction décimale". Cette durée, appelée D, correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée. La cinétique de destruction des microorganismes est, dans la grande majorité des cas, décrite par l'équation suivante:

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D}$$

Avec t le temps de traitement, N_0 la population initiale, N la population survivante au temps t et D la durée de réduction décimale.

Un autre paramètre, appelé paramètre de thermorésistance z, correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la durée de réduction décimale. Cette cinétique d'inactivation est encore actuellement la plus utilisée, et sert de référence au traitement thermique, ainsi qu'à la classification des espèces microbiennes.

I.1.4 Equipements industriels

Il existe une très large gamme d'équipements industriels, plus ou moins coûteux selon leur taille et leur consommation d'énergie. Par exemple, les systèmes d'autoclave sont utilisés depuis plus de 100 ans pour stériliser les aliments peu acides au-delà de 100°C. L'autoclave n'est qu'un des nombreux exemples d'équipements utilisés pour les traitements thermiques. Des systèmes continus d'échangeurs (à plaque, à spirale ou tubulaire...) sont fréquemment utilisés pour la pasteurisation de liquides (**Figures I.1 et I.2**). Le produit circule parallèlement à un fluide thermique, généralement à contre-courant (**Mafart, 1996**).

Le traitement thermique permet de décontaminer des produits avec leur emballage (cas de l'autoclave). Il faut pour cela que ledit emballage soit résistant à la chaleur et n'entraîne aucune migration indésirable au sein de l'aliment. Dans d'autres cas, ils peuvent être traités séparément. Certains emballages thermoformés acquièrent leur géométrie finale par chauffage rapide et à forte température. Ce procédé combine à la fois fabrication et décontamination. C'est le cas par exemple des bouteilles en plastique ou des pots de yaourt. Différentes matières sont utilisées, notamment des matières plastiques comme le polystyrène, le polyéthylène, le PET (polyéthylène téréphtalate) ou encore le polycarbonate (**Levy, 2012**).



Figure I.1: Pasteurisateur Industriel

(Boumendjel, 2007).



Figure I.2: Deux exemples de stérilisateurs statiques

(Exapro 2010; SteriflowthermalProcessing 2010).

I.1.5 Avantages du traitement thermique, limites, produits cibles

Les techniques de décontamination par traitement thermique sont anciennes et bien maîtrisées. Mais il faut, pour chaque produit, trouver le bon équilibre entre un chauffage en excès (qui réduit les qualités organoleptiques et nutritionnelles et peut produire des composés toxiques et des goûts indésirables) et un chauffage insuffisant (qui ne détruit pas suffisamment les microorganismes). Certains produits ont des contraintes encore plus marquées, comme par exemple la pasteurisation des œufs liquides, qui est limitée à des températures basses (et donc des temps plus longs) à cause de la coagulation des protéines (Huang *et al.*, 2006).

Les traitements thermiques peuvent être appliqués dans un but de cuisson des aliments. Tous les procédés de cuisson (grillage, fumage, rôtissage...) modifient les qualités organoleptiques ainsi que les propriétés nutritionnelles des produits dans le but de les rendre consommables. Dans cette configuration où de telles modifications sont souhaitées, il n'est pas nécessaire d'utiliser un autre moyen de décontamination. En revanche, dans le cas où ces traitements thermiques sont utilisés seulement dans un but de stabilisation microbologique des produits (pasteurisation, stérilisation), l'augmentation de température (et donc les modifications organoleptiques) peut être qualifiée d'indésirable (Chen *et al.*, 2010).

D'autres traitements physiques de décontamination sont aujourd'hui connus et utilisés, et sont une alternative très intéressante aux traitements thermiques. Tout comme la chaleur, ces traitements physiques sont propres, c'est à dire sans nécessité d'ajout de produits chimiques, mais ils peuvent également être athermiques, ce qui permettrait, dans le cas du traitement d'aliments, de préserver les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits.

I.2 Techniques non thermiques alternatives

Le prolongement de la durée de vie des aliments a été associé depuis bien longtemps aux procédés thermiques, seuls ou combinés avec des méthodes de préservation chimiques ou biochimiques. Cependant, ces procédés utilisant la chaleur tendent à réduire la qualité des produits et leur fraîcheur. La méthode idéale serait celle qui inactiverait les microorganismes et arrêterait les réactions de détérioration, n'utilisant ni chaleur ni froid, en un mot « non-thermiques ou athermiques », comme elles portent le nom de technologies innovatrices et/ou émergentes (**Ohlsson et Bengtsson**, 2010).

Le terme de procédé non-thermique est souvent utilisé pour désigner des technologies efficaces à température ambiante ou sublétales. La plupart de ces technologies émergentes peuvent être employées pour les aliments solides et liquides, cependant, il reste préférable d'adopter ces approches initialement pour les fluides, vu leur mode d'opération et leur facilité d'intégration dans des procédés continus. La combinaison de procédés non-thermiques avec les techniques thermiques conventionnelles ou autres, peut affecter la charge microbienne avec l'engagement de moins d'énergie. Cette approche est connue sous le nom de « Hurdle Technologie » (**Cullen et al.**, 2012).

D'après **Smithers** (2008), les procédés non thermiques améliorent non seulement l'innocuité microbiologique et la qualité de la chaîne des produits, mais trouvent de multiples autres applications, incluant :

- L'efficacité des procédés de transformation et l'amélioration de la qualité;
- Les fonctionnalités tant physiques que nutritionnelles et organoleptiques;
- La préservation des molécules bioactives instables;
- La modulation de l'activité enzymatique;
- Le développement d'ingrédients et produits hypo-allergènes.

On note l'existence de plusieurs techniques émergentes, on citera : les hautes pressions hydrostatiques, le champ électrique pulsé, l'irradiation, la lumière pulsée, les Ultraviolets, les microondes, les ultrasons, les infrarouges, les ondes magnétiques oscillatoires, le bombardement d'air ionique, la stérilisation plasmatique à pression atmosphérique, la microfiltration, la bactofugation. On peut séparer dans ce groupe, les traitements ionisants, qui regroupe toutes les technologies utilisant les rayonnements, qu'ils soient : microondes, infrarouges, ultraviolets (**Mafart**, 1996).

I.2.1 Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) et Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone (HPDC)

I.2.1.1 Principe

Le procédé des hautes pressions consiste à soumettre un produit alimentaire liquide ou solide, avec ou sans emballage, à des pressions comprises entre 100 et 800 MPa, à température ambiante ou inférieure à 50°C (**Doona et al.**, 2010). La durée de traitement est généralement comprise entre 5 et 30 min. Contrairement aux traitements utilisant la température, la pression est transmise instantanément et uniformément à travers le produit, indépendamment de sa taille, forme et composition (la montée en pression est généralement de 200 MPa/min). La pression étant la même dans toutes les directions, elle est qualifiée d'hydrostatique (**Figure I.3**). Cela permet de conserver la forme d'origine du produit. Même si la taille, la forme et la composition de l'emballage ne sont pas importants,

il doit comporter une partie flexible, pour éviter tout risque de rupture. Durant le traitement, le volume du produit diminue en fonction de la pression qui lui est imposée (environ 5% pour 100 MPa) et une expansion équivalente se produit durant la décompression (**Figure I.4**). La compression à laquelle l'aliment est soumis, provoque une augmentation de sa température, dépendante de sa composition (3°C pour 100MPa) (**Adams et Moss, 2008**).

Une autre technique de décontamination par haute pression, appelée HPDC, qui utilise le CO₂, présente de nombreux avantages. En effet, les pressions nécessaires à l'efficacité bactéricide sont moins élevées que dans le cas des HPH (**Figure I.5**). Les pressions utilisées sont généralement situées en dessous de 20 MPa, le traitement est donc plus facile à contrôler. De plus, le CO₂ est non toxique. La technique consiste à placer le produit au contact de CO₂ sub ou supercritique sous pression. Le point critique correspond à l'équilibre des phases gazeuse et liquide qui sont, pour le CO₂, une température de T = 31.1°C et une pression de P = 7.38 MPa. A température et pression inférieures à celles du point critique, le CO₂ est dans un état dit "subcritique"; et à l'inverse, à température et pression supérieures à celle du point critique, le CO₂ est dans un état dit "supercritique". Le CO₂ a un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. L'avantage du CO₂ supercritique est qu'il a une viscosité proche de celle des gaz, une densité proche des liquides et une diffusivité élevée. Il peut ainsi diffuser à travers les solides comme un gaz et dissoudre les matériaux comme un liquide (**Ohlsson et Bergtsson, 2010**).

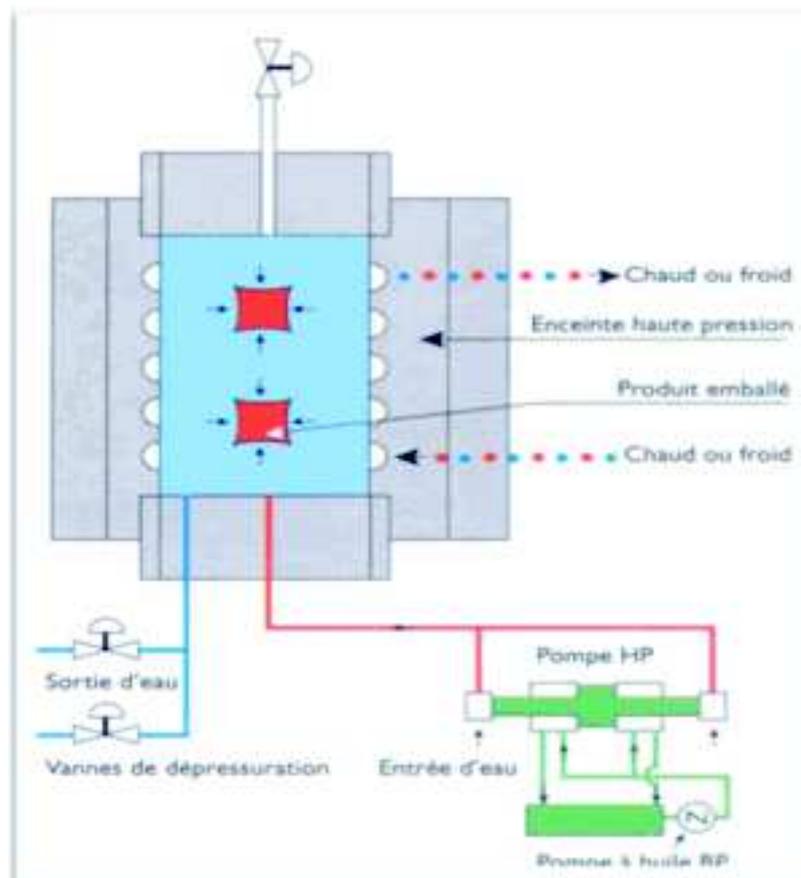


Figure I.3: Schéma d'un équipement industriel pour les Hautes Pressions (Calders, 2009).

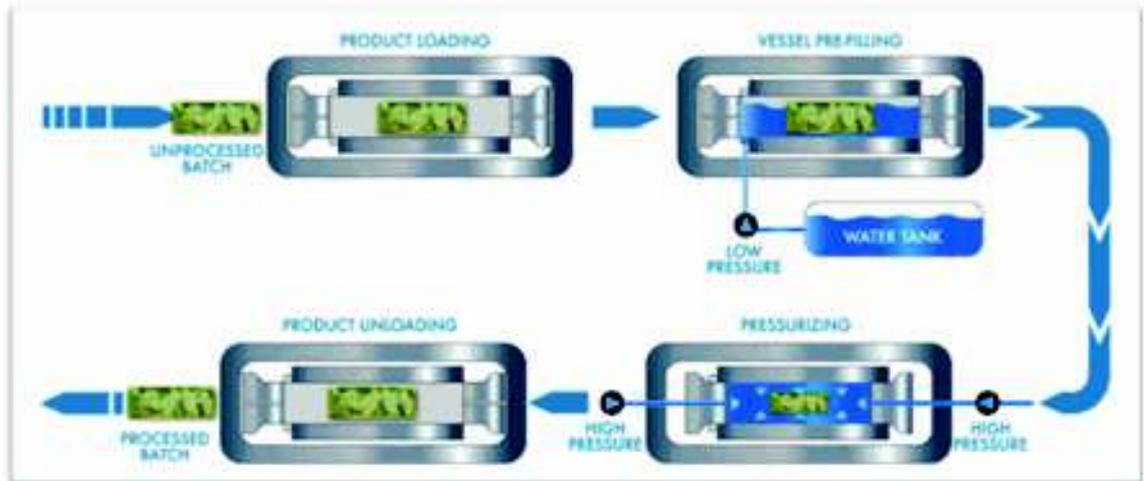


Figure I.4: Schéma expliquant le principe des Hautes Pressions (Calders, 2009).

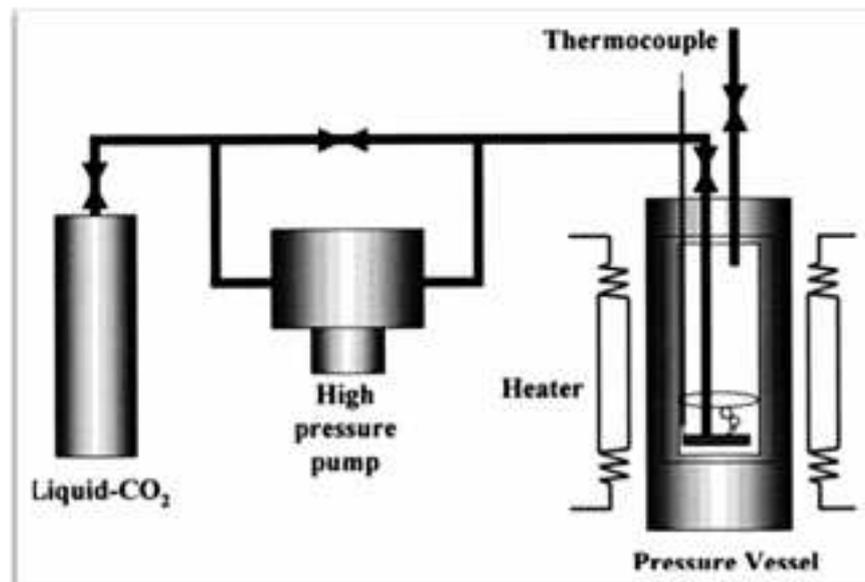


Figure I.5: Représentation schématique d'un équipement HPDC (Levy, 2012).

I.2.1.2 Mécanismes d'inactivation des microorganismes

Les mécanismes d'inactivation des microorganismes est la résultante de plusieurs réactions : la rupture des liaisons covalentes, la perméabilisation de la membrane cellulaire (Daryaei et Balasubramanian, 2012).

Le mode d'action va dépendre du niveau de pression. Les hautes pressions hydrostatiques entre 30 et 50 MPa peuvent avoir une influence sur l'expression des gènes et la synthèse protéique. A des pressions d'environ 100 MPa, la membrane nucléaire des levures est affectée et à 400-600 MPa, d'autres altérations sont visibles dans les mitochondries et le cytoplasme. L'inactivation due à la pression est accompagnée d'une augmentation de l'ATP extracellulaire, ce qui prouve une altération de la membrane (Buzrul, 2008).

I.2.1.3 Efficacité microbiologique

Les bactéries à Gram+ semblent plus résistantes que les Gram-. Les cellules en phase de latence ou stationnaire présenteraient une plus grande résistance que les cellules en phase exponentielle. Les spores bactériennes sont également plus résistantes que les cellules végétatives. La décontamination des spores nécessite le plus souvent de combiner pression et augmentation de température (**Montville et Matthews**, 2008). De plus, une alternance entre faibles pressions (initiant la germination) et pressions élevées (germicides) est une technique pouvant être utilisée pour le traitement de spores bactériennes fortement thermorésistantes comme *G. stearothermophilus*. On peut supposer qu'une succession de pression/dépression facilite la rupture des membranes cellulaires et peut ainsi causer la mort du microorganisme. Ainsi, des pressions plus faibles appliquées de manière discontinue pourraient avoir la même efficacité qu'un traitement continu à pression plus élevée (**Levy**, 2012).

Devlieghere et al ., en 2004, considèrent que les données sont encore insuffisantes pour introduire cette technique en industrie. L'application d'une technique en milieu industriel nécessite systématiquement des données quantitatives sur l'inactivation de microorganismes d'altération ou pathogènes, ainsi que des informations sur l'influence de la composition de l'aliment et des propriétés de la matrice. Dans le cas des hautes pressions, les informations systématiques sur la résistance microbienne sont limitées du fait des différentes conditions et méthodologies utilisées. Ainsi, seule la sensibilité des différents microorganismes au sein d'une même étude peut être comparée.

I.2.1.4 Equipements industriels

L'introduction et la commercialisation des hautes pressions pour la conservation des aliments date du début des années 90 au Japon (**Ohlsson et Bergtsson**, 2010). Dans le cas des HPH, les équipements industriels utilisés sont dits discontinus (en batch de 10 à 500 L) pour les solides et visqueux ou particulés, ou bien semi continu (de 1 à 4 tonnes/h) pour les liquides. Le système batch utilise une pompe qui envoie un fluide de pressurisation (généralement de l'eau) dans une enceinte close. Pour empêcher le contact avec le fluide de compression, le produit est obligatoirement traité dans son emballage hermétiquement clos. C'est pour cette raison que le procédé est discontinu, il faut charger ou décharger les aliments emballés dans l'enceinte dont le volume est réduit à environ 75% du volume interne (**Doona et al .**, 2010).

Dans le cas des produits liquides ou pâteux, le procédé semi continu peut être appliqué (**Figure I.6**). Le procédé est appelé semi continu lorsque les dispositifs sont composés d'une suite de plusieurs enceintes qui fonctionnent de façon décalée. La pression est générée par un piston au contact du milieu, qui réduit le volume de l'enceinte. Le produit doit ensuite être conditionné aseptiquement (**Morgan**, 2000).



Figure I.6: Exemple d'équipement haute pression industriel, Promatec, Belgique (Calders, 2009).

I.2.1.5 Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Les hautes pressions n'altèrent pas les liaisons covalentes. Les vitamines et composés aromatiques, essentiellement stabilisés par ce type de liaisons, ne sont donc pas endommagés. Cette propriété permet la conservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques de l'aliment. En revanche, les liaisons de faible énergie des macromolécules telles que les protéines, les polysaccharides et les acides nucléiques peuvent être modifiées parfois de façon irréversible après dépressurisation. Afin d'obtenir une décontamination microbiologique plus élevée, un couplage des hautes pressions avec un autre traitement tel qu'un préchauffage doux permet une meilleure efficacité (**Sampedro et al .**, 2010).

De nombreuses études ont montré l'application possible des hautes pressions sur des produits alimentaires tels que les confitures, les jus de fruits, les amandes, les graines, les salades réfrigérées, les entrées, les sauces, etc. (**Donna et al .**, 2010). En revanche, le traitement du lait par hautes pressions s'est révélé être une alternative peu intéressante à la pasteurisation. De plus, l'environnement physicochimique complexe du lait (sans autre précision) semble exercer un effet protecteur sur les microorganismes. Bien que le traitement des jus de fruits par HPH montre une réelle efficacité décontaminante, il reste un traitement semi-continu, pouvant donc présenter un frein en termes de rendement industriel. Les aliments peu acides restent en général de bons candidats à ce type de traitements (**Mafart**, 1996). Les jus de fruits traités par HPH sont commercialisés au Japon depuis 1990. Le traitement peut s'effectuer sur des aliments déjà emballés. Dans ce cas, il n'y a pas de risques de contamination post-traitement.

I.2.2 Champs électriques pulsés (CEP)

I.2.2.1 Principe

Un générateur à haute tension est utilisé pour charger des condensateurs ou une ligne de transmission. Un interrupteur ou switch à haute tension permet de décharger rapidement l'énergie stockée dans les condensateurs. Le signal ainsi généré a une forme carrée, exponentiel ou bipolaire avec des fronts de montée de l'ordre de la nanoseconde, une durée de quelques dizaines de nanosecondes et une amplitude de plusieurs kilovolts. L'aliment est placé entre deux électrodes. La distance entre électrodes vaut quelques centaines de micromètres ce qui permet de générer des champs de plusieurs dizaines de kV/cm. L'intensité du champ électrique appliqué est généralement comprise entre 2 et 87 kV/cm, mais les taux d'inactivation efficaces sont généralement obtenus avec des champs d'intensité comprise entre 20 et 50 kV/cm (**Figure I.7**). Les temps de traitement sont généralement exprimés en micro ou millisecondes (**Amiali et Ngadi, 2012 ; Jun et Irudayraj, 2009**).

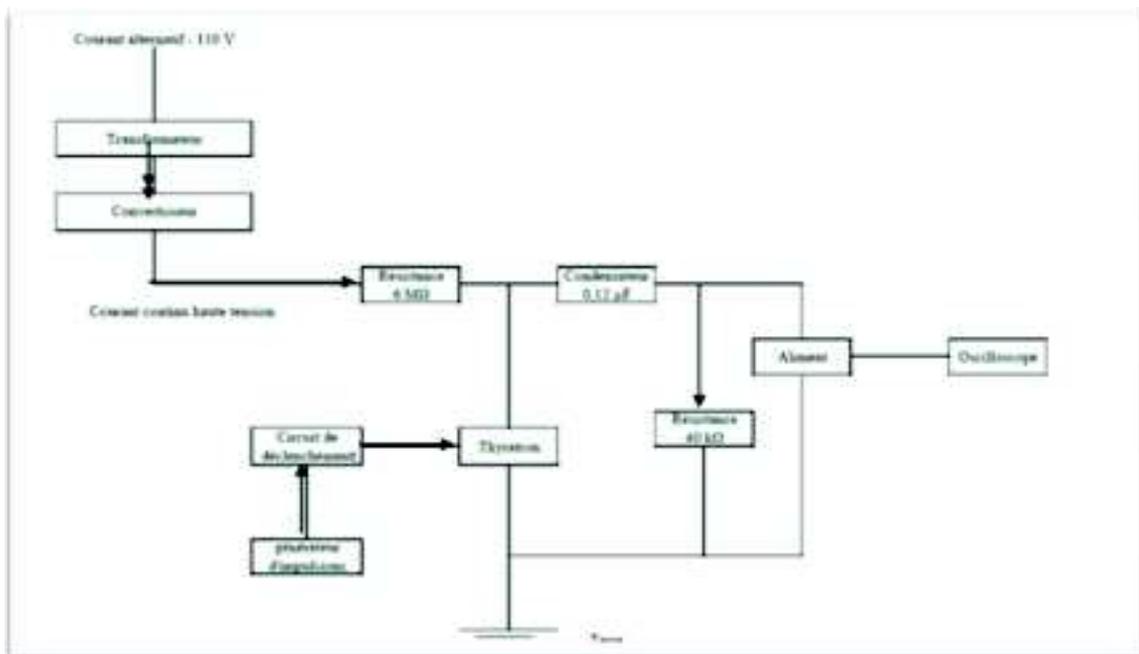


Figure I.7: Schéma d'un équipement CEP

(Wu et al., 2005).

I.2.2.2 Mécanismes d'inactivation

Cette technologie utilise la propriété d'une membrane de devenir perméable sous l'effet d'un champ électrique. Cette propriété est traditionnellement utilisée pour transférer des gènes ou des molécules dans des cellules. Dans ce cas, les impulsions de tensions courtes ont une durée de l'ordre de la microseconde et une amplitude de l'ordre du kilovolt (effet réversible). Cependant, en réduisant la durée des impulsions à quelques dizaines de nanosecondes et en augmentant leur amplitude pour atteindre plusieurs kilovolts, l'effet devient irréversible. Cette propriété est donc utilisée pour la décontamination (**Amiali et Ngadi, 2012 ; Kempkes, 2010 ; Fellows, 2000**).

Les mécanismes conduisant à l'inactivation de la cellule ne sont à ce jour pas encore compris et différentes hypothèses existent. Le champ électrique provoque des changements au niveau des membranes des cellules par dommage mécanique direct causant sa rupture

(Electric Breakdown Theory) ou en déstabilisant les lipides et protéines de la membrane formant des pores (Electroporation), celle-ci perd sa semi-perméabilité sélective, l'eau entre dans la cellule qui enflé et se rompt. (Doona *et al* , 2010).

I.2.2.3 Efficacité microbiologique

Les endospores des bactéries, tout comme les ascospores des moisissures, semblent résistantes aux CEP (Vignola, 2010).L'efficacité des CEP dépend de nombreux facteurs dont le type de microorganisme, leur état physiologique et leur concentration initiale. Les bactéries à Gram- semblent ici, comme pour les hautes pressions, plus sensibles au traitement que les Gram+, et les cellules en phase de croissance semblent également les formes les plus sensibles. Des facteurs environnementaux semblent aussi jouer un rôle important: la force ionique du milieu, le pH, l'activité de l'eau, la viscosité, la présence de particules solides ou de gouttes d'huile. En effet, une faible force ionique du milieu pourrait augmenter l'efficacité du traitement. En revanche, l'augmentation de la concentration en protéines et lipides permet une plus grande résistance microbienne. Les protéines contenues dans le lait absorberaient les radicaux libres ainsi que les ions nécessaires à la destruction des cellules. Les lipides contenus dans du lait pourraient quant à eux modifier la conductivité du milieu et ainsi protéger les microorganismes des CEP (Lelieveld *et al* ., 2007).

Les paramètres physiques des CEP entrent également en jeu, comme l'amplitude du champ, la fréquence des impulsions et le temps de traitement. La température est aussi un facteur important mais ses effets sont plus complexes. Une plus grande sensibilité des bactéries est observée à des températures de l'ordre de **50-60°C** par rapport à **10-30°C**, certainement à cause de l'augmentation de la fluidité et donc de la fragilité des membranes à plus haute température (Amiali et Ngadi, 2012 ; Montville et Mathhews, 2008).

I.2.2.4 Equipements industriels

Les équipements sont chers, rares, et de capacité limitée. Leur prix (estimation début des années 2000) pouvait aller de 40 000 à 500 000 dollars US, avec un coût de fonctionnement estimé à 0.2 dollar/L. Aux Etats-Unis, Pure Pulse Technologies propose des équipements pour traiter des aliments liquides à 35-45 kV/cm avec un débit allant de 3000 à 8000 L/h, depuis 1996 (Gongora-Nieto *et al.* , 2002).

I.2.2.5 Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Le CEP peut être appliqué pour le traitement des différents jus de fruits, lait et produits laitiers et les œufs et dérivés, comme il peut être appliqué pour l'extraction des jus et des composantes de plantes. Aucun changement significatif sur les propriétés sensorielles du lait n'a été remarqué. Dans le cas des champs électriques pulsés, un procédé continu est possible, mais limité à des produits liquides. Durant la décharge du champ électrique, du chauffage ohmique est provoqué, causant l'augmentation de la température du produit, donc la présence d'un système de refroidissement est préférable (Amiali et Ngadi, 2012 ; Doona *et al* , 2010).

Des contaminations des produits liquides est à prendre en considération, cas de la bière, les migrations significatives des composants des électrodes (Fe, Cr, Zn, Mn) peuvent provoquer une perte de saveur au-delà d'une certaine dose (Levy, 2012).

I.2.3 Irradiations

I.2.3.1 Principe

La décontamination par irradiation fait référence à trois types de phénomènes physiques: le rayonnement gamma, le rayonnement X et les faisceaux d'électron.

Le rayonnement γ correspond à l'émission spontanée de photons par le noyau d'un isotope radioactif. Sa longueur d'onde est en général inférieure à 10 pm. Ce phénomène a été découvert par Paul Villard en 1900. Les rayons X sont des ondes électromagnétiques émises par les couches électroniques profondes des atomes. Leur longueur d'onde est comprise entre

0,01 et 10 nm. Cette partie du spectre électromagnétique a été identifiée par Wilhelm Röntgen en 1895 (**Boumendjel**, 2005). Les faisceaux d'électrons font référence à un déplacement d'électrons créés à partir d'une source. Les tubes à vides permettant de créer les faisceaux d'électrons ont été inventés dans leur forme moderne par Karl Braun en 1897. L'irradiation des aliments a commencé avec le programme "Atoms in peace" du Président Eisenhower au début des années 1950.

Les techniques d'irradiation ont l'avantage de pouvoir traiter le produit en surface et en volume. Les rayons X durs et gamma sont très pénétrants donc il est possible de traiter des produits ayant un volume important. Les temps d'exposition sont de l'ordre de l'heure. Les faisceaux d'électrons pénètrent moins profondément dans la matière mais suffisamment pour traverser des films ou des emballages. Ainsi l'avantage des faisceaux d'électrons est le fait que les aliments peuvent être traités à travers leur emballage, et même congelés ou réfrigérés (**Figure I.8**). Il est à noter qu'un traitement de forte énergie donne des résultats satisfaisants sur des épaisseurs allant jusqu'à 3,5 cm (**Adams et Moss**, 2008).

Pour ces types de rayonnements, la dose est généralement exprimée en Gray. Un Gray correspond à une énergie absorbée d'1 joule par kg de produit traité. Les doses habituellement utilisées sont comprises entre 0.01 et 10 kGy. Ces types de radiations ont été choisis car ils produisent les effets désirés sur l'aliment, sans induire de radioactivité au sein du produit ou de l'emballage et permettent une utilisation industrielle en matière de quantité et de coût de fonctionnement (**Sommers**, 2012).

Le terme "radapertisation" est employé pour décrire l'ionisation appliquée aux aliments préemballés dont les enzymes ont été inactivées, à des doses déterminées pour qu'aucune altération ou toxicité ne surviennent quelles que soient les conditions et durées de stockage (en l'absence de contamination post-process). Le traitement par irradiation peut être un réel avantage en matière de sécurité alimentaire (**Ohlsson et Bengtsson**, 2010).

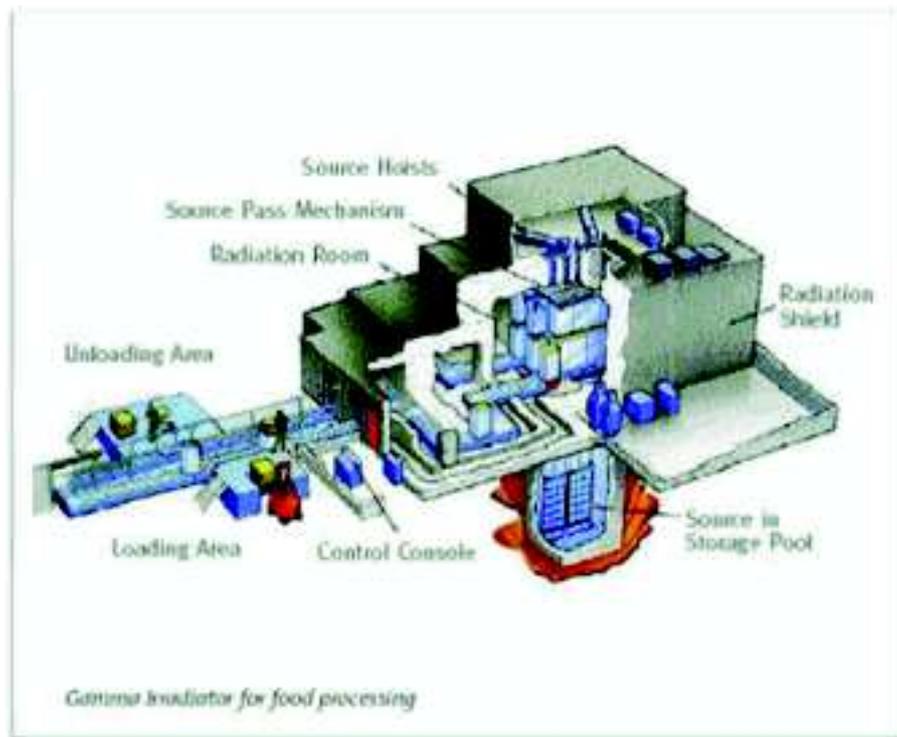


Figure I.8: Principe d'une unité de traitement des aliments aux rayons γ (Ferrandon,2008).

I.2.3.2 Mécanismes d'inactivation

Sous irradiation, les molécules absorbent de l'énergie des ions ou des radicaux libres très réactifs, rompant ainsi les liaisons chimiques. La mort cellulaire est engendrée par l'endommagement du matériel génétique, représentant l'effet majeur de l'irradiation sur les microorganismes dans les aliments (**Ohlsson et Bengtsson**, 2010). Diverses modifications peuvent être induites dans la structure de l'ADN: oxydation du désoxyribose et libération d'une base par hydrolyse, pontage entre bases d'un même brin ou entre bases appartenant à deux brins différents, hydroxylation des bases et en particulier de la thymine, avec formation de peroxydes en présence d'oxygène. Mais les altérations les plus fréquemment observées sont des ruptures monobrin entre la base et le sucre d'un nucléotide, essentiellement produites par action des radicaux hydroxyles. Lorsqu'il y a cassures simultanées des brins à des distances très voisines dans l'ADN, ces ruptures double brins (10 fois moins probables que les ruptures simple brin) ont des conséquences beaucoup plus dramatiques pour la survie de la cellule (**Nicholson et al.**, 2000).

I.2.3.3 Efficacité microbiologique

Les doses utilisées pour détruire la plupart des bactéries pathogènes sont moyennes et vont de 1,5 à 4,5 kGy, alors que pour les spores bactériennes et les virus, de fortes doses allant de 10 à 45 kGy sont nécessaires (**Doona et al.**, 2010).

Les bactéries Gram- sont ici encore plus sensibles que les Gram+ et les spores toujours plus résistantes que les cellules végétatives, bien que quelques espèces se soient avérées très résistantes dans leur forme végétative (exemple de *Deinococcus radiodurans*). Les virus sont quant à eux très résistants aux irradiations (**Figure I.9**). De nombreux facteurs

influencent fortement l'efficacité de ces traitements: la composition du milieu, l'activité de l'eau, la température lors du traitement, la présence d'oxygène (qui augmente la sensibilité), la congélation (la dose nécessaire pour l'inactivation de 90% de la population est 2 à 3 fois plus élevée dans les aliments congelés que dans les aliments frais) (Levy, 2012).

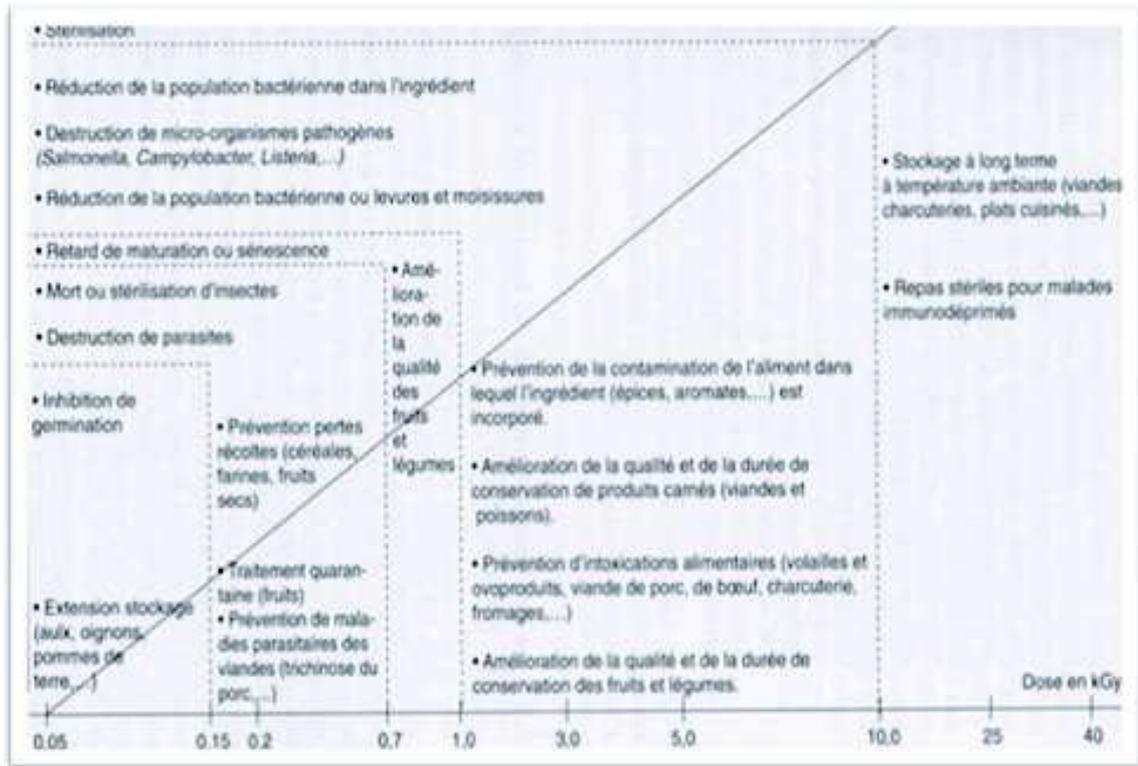


Figure 1.9: Effet des traitements ionisants en fonction de la dose appliquée (Federighi et Tholozan, 2001).

I.2.3.4 Equipements industriels

Ils consistent en une chambre d'irradiation contenant une source de radiation, dans laquelle les produits à traiter sont envoyés par un convoyeur, avec des espaces de chargements et de déchargements. Cette chambre doit être bien isolée pour éviter tout danger (Ohlsson et Bergtsson, 2010).

Les équipements peuvent être relativement peu encombrants (faisceaux d'électrons accélérés), ou très imposants (rayons γ). Le coût des machines est très élevé, et varie selon la puissance et le type de rayonnement. Il existe des équipements allant de 3,1 à 5,6 millions de dollars US, avec un prix de fonctionnement variant entre 1 et 1,4 cent (\$) par 500g de produit (Sadat, 2004).

I.2.3.5 Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Aucune augmentation de température n'est observée, ce qui classe ce traitement en procédé athermique. Cette technologie est appliquée pour la désinfection du matériel médical et les produits de process dans le domaine alimentaire (Ohlsson et Bergtsson, 2010).

Selon le produit, une forte dose d'irradiations (par exemple au-dessus de 6.5 kG pour l'agneau) peut altérer le goût et la couleur des aliments, notamment de la viande. Les polysaccharides comme la pectine peuvent être dégradés suite à de trop fortes doses d'irradiation, ce qui peut causer une perte de fermeté des fruits et donc une diminution de leur durée de vie (**Levy**, 2012).

Cette technique reste non applicable pour le lait, car pourrait causer des changements de saveurs d'odeurs et une décoloration (**Doona et al** , 2010). Un sur traitement ou un traitement exagéré pourrait détériorer la qualité du lait et produits laitiers d'une manière irréversible (**Demirci et Ngadi**, 2012).

Même s'il a été démontré que les produits irradiés ne peuvent en aucun cas devenir radioactifs (car à aucun moment le produit ne rentre en contact avec la source radioactive), le traitement par irradiation est encore difficilement accepté par les consommateurs. Selon **Ohlsson et Bergtsson** (2012), La technologie de l'irradiation reste discutable.

I.2.4 La lumière pulsée

I.2.4.1 Principe

Les premiers travaux de désinfection (Japon) datent de la fin des années 70, et le premier brevet de 1984. La lumière pulsée se définit par des impulsions ou flashes de lumière produits par une lampe à arc au xénon. Le spectre d'émission de la lampe couvre le domaine en longueurs d'ondes s'étendant entre 200 et 1300 nm incluant UV, visible et infrarouge (**Demirci et Ngadi**, 2012). La durée des flashes varie entre la microseconde et la milliseconde. L'énergie nécessaire à l'allumage de l'arc est accumulée dans un condensateur puis déchargée dans la lampe. La décharge est possible à la condition que le gaz soit préionisé. La préionisation est obtenue grâce à un signal dit trigger (haute tension et faible courant). Elle permet d'initier l'avalanche électronique nécessaire pour rendre le gaz conducteur (phénomène de claquage). L'énergie électrique accumulée dans le condensateur est libérée dans le canal conducteur. Les atomes de xénon sont excités et ionisés lors du passage du courant (plusieurs centaines d'ampères). Le phénomène de passage à l'arc permet de libérer toute l'énergie électrique stockée. La décharge se coupe ensuite. Le retour à l'état fondamental des atomes de xénon se fait par l'émission de photons dont la longueur d'onde varie entre l'UV et l'infrarouge. Le spectre produit dépend des paramètres électriques du circuit de décharge. Comme pour les lampes utilisées dans le cas des UV continus, l'enceinte dans laquelle se trouve le gaz est en quartz. La dose reçue par le produit est généralement décrite par la fluence (J/cm^2), représentant l'énergie reçue par unité de surface de la cible (unité également utilisée dans le cas des traitements par UV continus) (**Mafart**, 1996).

Selon **Levy** (2012), le traitement est caractérisé par d'autres paramètres physiques :

- la tension appliquée aux bornes des lampes (V) qui en plus d'avoir une influence sur la fluence (plus la tension est élevée, plus la fluence du flash est élevée) détermine la qualité du spectre émis (% d'UV) ;
- l'éclairement crête (W/cm^2) représente la puissance maximum sur $1cm^2$ de la surface pendant la durée d'un flash ;
- la fluence (J/cm^2), qui représente l'énergie accumulée sur $1cm^2$ de la surface pendant la durée du traitement (un ou plusieurs flashes) ;
- le nombre de flashes émis.

I.2.4.2 Mécanismes d'inactivation

Ohlsson et Bergtsson (2010), décrivent deux types de mécanismes pour expliquer l'inactivation due à la LP :

- l'action photochimique des longueurs d'onde UV
- l'action photothermique du spectre entier.

L'action photochimique, mécanisme d'action également retrouvé dans le cas du traitement

UV continu, aurait un effet direct sur la molécule d'ADN. En effet, les UV-C (200-280 nm) provoqueraient la formation de dimères de pyrimidine (en particulier de thymine), inhibant la formation de nouveaux brins d'ADN dans le processus de réplication et entraînant la mort du microorganisme. De nombreuses études définissent l'absorption des UV comme la cause majeure d'inactivation des microorganismes par lumière pulsée, signifiant dans ce cas que l'unique différence de cette technologie par rapport à une émission continue d'UV serait la réduction du temps de traitement.

Un deuxième mécanisme est parfois décrit comme intervenant dans l'efficacité germicide de la lumière pulsée: le mécanisme photothermique ; la désinfection est provoquée par rupture des membranes, du fait de la brève mais intense élévation de température au niveau du microorganisme (**Gomez-Lopez et al .**, 2007).

I.2.4.3 Efficacité microbiologique

Les spores de moisissures semblent être plus résistantes que les bactéries à Gram+, elles-mêmes plus résistantes que les Gram-.

Selon **Demirci et Ngadi** (2012), les facteurs intervenant dans l'efficacité de la lumière pulsée sont :

- Facteurs liés au système d'éclairage :
 - la fluence reçue au niveau du microorganisme ;
 - la tension appliquée aux bornes des lampes ;
 - le type et la forme des réflecteurs qui déterminent les angles d'incidence du rayonnement sur la surface.
- Facteurs liés à la cible :
 - le microorganisme cible ;
 - la nature et la rugosité de la surface traitée ;
 - la densité de population dans le cas des traitements de volumes de liquide ;
 - la composition des aliments ;
 - l'épaisseur de la cible ;
 - Influence des facteurs liés au système d'éclairage.

I.2.4.4 Equipements industriels

Les équipements de lumière pulsée varient d'un équipementier à l'autre, mais le système reste le même. L'énergie électrique est stockée dans un condensateur. Un signal va déclencher la décharge de l'énergie électrique sur une ou plusieurs lampes à xénon. Les lampes sont le plus souvent équipées de systèmes de refroidissement par eau et sont

protégées par des tubes en quartz. Les lampes sont équipées de réflecteurs (en aluminium poli) de formes différentes selon la géométrie du produit à traiter. Le design des réflecteurs est un élément clé, responsable de la focalisation des rayons lumineux sur la cible. Ainsi, les équipements vont être différents (nombre de lampes, forme des réflecteurs), selon le produit traité. Le traitement par lumière pulsée peut être discontinu ou bien continu avec des cavités adaptées aux lignes de production (**Figure I.10**).

Le prix des équipements varie en fonction de la complexité de la machine et surtout du nombre de lampes nécessaires. L'avantage de la technologie est également en termes de coût de fonctionnement. En effet, la consommation d'électricité est faible et les opérations de maintenance se limitent le plus souvent au changement des lampes usagées. L'encombrement des machines est limité, avec une adaptation très simple sur les lignes de production, nécessitant le plus souvent une cavité de quelques dizaines de centimètres de large (**Levy, 2012**).



Figure I.10: Equipement industriel de la lumière pulsée

(Levy, 2012).

I.2.4.5 Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Le traitement LP, du fait de la durée des flashes (200 μ S), est un traitement rapide (souvent quelques secondes) et reste dans certains cas suffisant pour l'obtention d'une destruction totale des microorganismes en surface du produit (**Vignola, 2012**). Travailler avec de la lumière (comme le traitement UV continu), ne nécessite l'utilisation d'aucun produit chimique. Il n'y a donc aucun composé résiduel à éliminer. De plus, les lampes, contrairement aux lampes utilisées pour l'émission continue d'UV, ne contiennent pas de mercure. Lors des traitements impliquant un grand nombre de flashes, un échauffement de la cible peut se produire. Il est également possible qu'un dégagement d'ozone ait lieu. Les sources lumineuses (UV comme lumière pulsée) restent sensibles aux effets d'écran. Tout élément pouvant ainsi s'interposer entre le rayon lumineux et le microorganisme, le protégera de la destruction. Il sera donc impossible d'utiliser la lumière pulsée sur de grandes épaisseurs.

Les traitements de surfaces seront à l'inverse tout à fait accessibles à la technologie. Les surfaces plus irrégulières au niveau microscopique seront en règle générale plus difficiles à traiter. Les traitements plus invasifs, sur des suspensions liquides par exemple, ne pourront se réaliser que sur des liquides clairs et sur de faibles épaisseurs.

Les aliments riches en protéines et acides gras ne sont pas de bons candidats pour le traitement, car les protéines et l'huile, ajoutées au milieu de culture des microorganismes, diminuent l'efficacité de la lumière pulsée. En revanche, les fruits ou les légumes seront des cibles adéquates, du fait de leur composition. Cependant l'altération de certaines propriétés physiologiques des aliments (et notamment des légumes) peut être provoquée par la LP tout autant que par les UV continus (**Alexandre et al**, 2012).

I.2.5 UV continus

I.2.5.1 Principe

Le traitement UV continu est une méthode athermique, non chimique et considérée comme non ionisante (**Demirci et Ngadi**, 2012). L'émission UV est produite dans une lampe à vapeur de mercure. La lampe se compose d'une enceinte en quartz dans laquelle réside un mélange d'argon et de mercure. Deux types de lampes sont différenciés selon la pression dans l'enceinte : lampes dites basse pression et lampes dites moyenne pression. Dans les deux cas, l'émission est produite lors de la désexcitation du mercure préalablement chauffé puis ionisé. Le spectre d'émission varie grandement avec la pression. Il est monochromatique à basse pression avec un pic principal d'émission à 254 nm (il existe un pic d'émission moins intense à 184 nm coupé par l'enveloppe). A moyenne pression, c'est un spectre de raies présentant plusieurs maxima (254, 365, 405, 436, 546, 578 nm). Les deux types de lampes émettent des UV dans la région 200-280 nm du spectre. Cette région correspond communément aux UV-C parfois nommé UV "germicides" car ils sont responsables de l'inactivation des virus et bactéries. Les longueurs d'onde les plus destructrices se situent entre 240 et 280 nm (**Montville et Matthews**, 2008). La grandeur caractérisant le flux lumineux reçu par les microorganismes est l'éclairement (en W/cm²). La dose tient compte de la durée d'exposition et est homogène à une fluence (J/cm²). Pour les liquides, le J/L est également utilisé. Les UV continus en tant que méthode de conservation ont une image positive vis-à-vis des consommateurs. Les traitements sont déjà utilisés pour décontaminer l'eau, l'air et les surfaces. Ainsi, aux Etats-Unis, depuis les années 1930, les radiations UV à 254 nm sont utilisées pour réduire le nombre de bactéries dans l'air des blocs opératoires en milieu hospitalier.

I.2.5.2 Mécanismes d'inactivation

Les radiations UV ont un mécanisme d'action assez similaire aux irradiations: elles causent des ruptures au sein de la molécule d'ADN, ainsi que des dimères de pyrimidine(notamment de thymine, lésions les plus fréquemment retrouvées chez les cellules végétatives). Ces lésions bloquent la réplication et la transcription, compromettant les fonctions cellulaires et entraînant la mort de la cellule (**Doona et al**, 2010).

Cet effet est corrélé à l'absorption des UV par les acides nucléiques, située entre 200 et 310 nm, avec un maximum à 260 nm (**Adams et Moss**, 2008). Les systèmes de réparation de l'ADN sont des éléments mis en place par les cellules pouvant contrer les effets du traitement UV. Dans le cas des cellules végétatives, des phénomènes de photoréactivation peuvent se produire et également conduire à la réparation des lésions causées sur l'ADN du microorganisme, lorsqu'il est exposé à la lumière du soleil après traitement (**Levy**, 2012).

I.2.5.3 Efficacité microbiologique

Le traitement UV est décrit comme simple, respectueux de l'environnement, et permettant de détruire une large gamme de microorganismes dans l'eau (**Demirci et Ngadi, 2012**).

De manière générale, les bactéries à Gram- sont plus facilement détruites que les Gram+, les spores (de bactéries et moisissures) sont plus résistantes que les cellules végétatives. Les virus sont également plus résistants aux UV que les cellules bactériennes (**Adams et Moss, 2008**). Il est à noter que la résistance aux UV dépend de la présence de pigments cellulaires et fait le lien entre les pigments noirs de certaines moisissures et leur forte résistance aux UV. En effet, la mélanine contenue dans les spores serait un composé photoprotecteur et augmenterait la survie des spores fongiques en les protégeant des radiations UV.

1.2.5.4 Equipements industriels

Les sources d'UV généralement utilisées sont des lampes à vapeur de mercure basse pression (102 à 103 Pa), basse pression à haut rendement, ou moyenne pression (104 à 106 Pa).

Le mercure (accompagné d'un gaz inerte comme l'argon) est enfermé dans un tube en silice scellé aux deux extrémités, et connecté à des électrodes. L'émission des lampes moyennes pression est polychromatique (250 à 600 nm), avec des énergies émises de 5 à 30 W/cm, contrairement aux lampes basse pression qui sont monochromatiques, et dont l'énergie émise se situe plus aux alentours des 0.5 W/cm (**Koutchma, 2009**).

1.2.5.5 Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Aucun composé ni sous-produit toxique connus ne sont formés à cause des UV, que le traitement de l'eau n'a entraîné aucune apparition de mauvais goût ou odeur, qu'il n'y a pas de changement de couleur du jus de pomme traité, et que le traitement nécessite peu d'énergie comparé à la pasteurisation. Le traitement UV est aussi utile pour traiter des matériaux qui ne résistent pas à l'autoclave (**Ortega-Rivas, 2012**).

De plus, un traitement UV appliqué au jus d'orange n'a montré aucune modification de couleur ni de pH du produit, juste des pertes en vitamine C semblables aux traitements thermiques.

Les UV présentent une très faible capacité de pénétration, il s'agit donc le plus souvent d'un traitement de surface sauf pour les produits transparents aux UV. En effet, 90% des UV sont absorbés sur 1mm de jus de fruit et la faible pénétration est d'autant plus accentuée que le liquide est opaque.

Le facteur limitant le plus évident de ce traitement est sans aucun doute l'effet d'écran. La faible pénétration des UV permet uniquement une application en surface, et le traitement sera inefficace sur des microorganismes disposés en amas ou biofilms, ou protégés par de la matière organique. Le traitement par émissions continues d'UV est certes un traitement respectueux de l'environnement, car aucun composé chimique n'est utilisé et aucune source radioactive n'est nécessaire. En revanche, le mercure contenu dans les lampes pose des problèmes environnementaux lors de leur élimination (**Kelklic et Demirci, 2012**).

Ce traitement est plus approprié pour les produits liquides pré-filtrés ou clarifiés, et représente un intérêt considérable dans la pasteurisation du lait. Les applications dans les industries agroalimentaires pour la pasteurisation des aliments est indisponible pour le moment (**Doona et al., 2010**).

Les applications les plus courantes sont la désinfection de l'air, des surfaces, des emballages (boîtes, bouchons, bouteilles, cartons, tubes, films, opercules...) et de l'eau. Les liquides transparents seront des cibles plus faciles que les liquides opaques, grâce à une pénétration des UV sur une épaisseur plus importante (**Ohlsson et Bergtsson**, 2010).

Le traitement aux UV reste une alternative peu séduisante pour résoudre des problèmes de forte contamination, entraînant une répartition des microorganismes en amas et diminuant ainsi la probabilité de chaque germe d'être directement soumis aux UV.

I.2.6 L'étude approfondie du traitement aux UV présente-t-elle un réel intérêt par rapport aux autres techniques physiques de décontamination ?

Le traitement aux UV nécessite la transmission des rayonnements ou l'illumination de la totalité de la zone à traiter est nécessaire à son efficacité. Il est adapté au traitement en surface. Contrairement au traitement thermique, aux hautes pressions ou encore à l'irradiation, il ne peut convenir au traitement de produits opaques. Cependant, il est possible de décontaminer les liquides pour lesquels le coefficient d'absorption dans l'UV et le débit du liquide sont adaptés. Les UV entrent dans les nouvelles perspectives concernant le traitement des aliments. En effet, les technologies athermiques et propres sont un sujet de développement très prometteur et donc très étudié. Le fait d'éliminer totalement l'utilisation de produits chimiques est un avantage à la fois économique et environnemental. L'absence d'échauffement des aliments préserve les qualités organoleptiques et nutritionnelles, sujet fondamental à l'heure actuelle. La technologie, probablement moins coûteuse à mettre en place industriellement que l'irradiation, transmet aussi une image beaucoup moins négative auprès des consommateurs, n'étant pas un procédé émettant ou utilisant de la radioactivité. Les temps de traitement sont généralement très courts, ce qui est un avantage certain pour l'installation sur les chaînes de production. La possibilité d'appliquer des traitements en mode continu est également un atout par rapport à d'autres traitements appliqués préférentiellement de manière discontinue (en batch ou semi batch par exemple), ou nécessitant de faibles volumes (**Rajkovic et al.**, 2010).

Le recensement d'articles scientifiques publiés considérant les traitements thermique ("heat"), la lumière pulsée ("pulsed light"), les champs électriques pulsés ("pulsed electricfield"), les hautes pressions ("high pressure") les UV continus ("UV or uv or ultraviolet") et les irradiations ("irradiations or γ rays or X rays or electronbeam") a été effectué. Il fait état de la quantité d'articles disponibles sur chacune des technologies présentées ici et leur évolution depuis 1980. Comparée au traitement thermique, les UV sont beaucoup moins représentés en termes de quantité de données.

Chapitre II : les rayons Ultraviolets

II.1 Présentation des rayons Ultraviolets

II.1.1 Historique

L'existence des rayons UV est mise en évidence en 1801 par J.W. RITTER, physicien allemand, ils ont d'abord été dénommés « Rayons Chimiques ».Le premier appareil de production UV est construit en 1910 à Marseille, mais ses lampes en quartz (opaques et non-transparentes) ne sont pas encore sûres. Les années 40, les premières lampes à décharge dans les gaz sont construites et optimisées pour l'application à la désinfection de l'eau. L'année 1955 a connu l'apparition de l'une des premières installations de traitement UV, en Suisse, pour le traitement des eaux publiques. Par la suite, de nombreuses études sur le comportement des microorganismes soumis aux UV conduisent à de nouvelles possibilités : purification de l'air, de l'eau, des surfaces des matériels... La décontamination devient alors réalisable sans recourir aux additifs (**Kowalski**, 2009 ; **Rosset et Rosset**, 1996).

II.1.2 Définitions

« Ultraviolets » est le nom donné aux rayonnements électromagnétiques s'étendant dans la gamme des longueurs d'ondes situées d'une part immédiatement en deçà du violet, en extrémité du spectre visible (400nm) et d'autre part avant les rayons X (100nm). Le spectre des rayonnements UV est donc par définition compris entre 100 et 400nm et est invisible (**Rosset et Rosset**, 1996). La lumière UV est non-ionisante, non- chimique et athermique ce qui reste une technique respectueuse pour l'environnement, facile à appliquer et économique (**Demirci et Ngadi**, 2012).

Pour éviter de faire peur aux consommateurs, les scientifiques préfèrent utiliser le terme « illumination » au lieu de « irradiation » qui prête à confusion (**Cullen et al.**, 2012).

D'après **Ohsson et Bergtsson** (2010), les rayonnements UV présentent des effets différents selon leur longueur d'onde. Aussi, le spectre UV est-il arbitrairement en 3 bandes comme suit (**Figures II.1 et II.2**) :

- UV-A, ondes longues entre 315-400nm, à effet bronzant.
- UV-B, ondes moyennes entre 280-315nm à effet érythémateux.
- UV-C, ondes courtes entre 100-280nm à propriétés germicides et photochimiques.

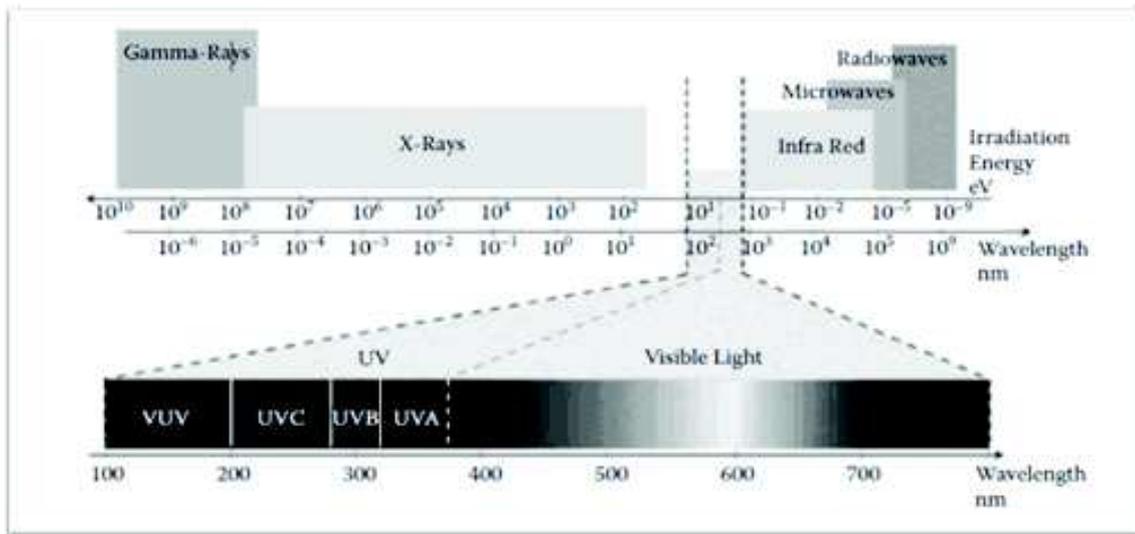


Figure II.1: Spectre des radiations électromagnétiques

(Koutchma et al., 2009).

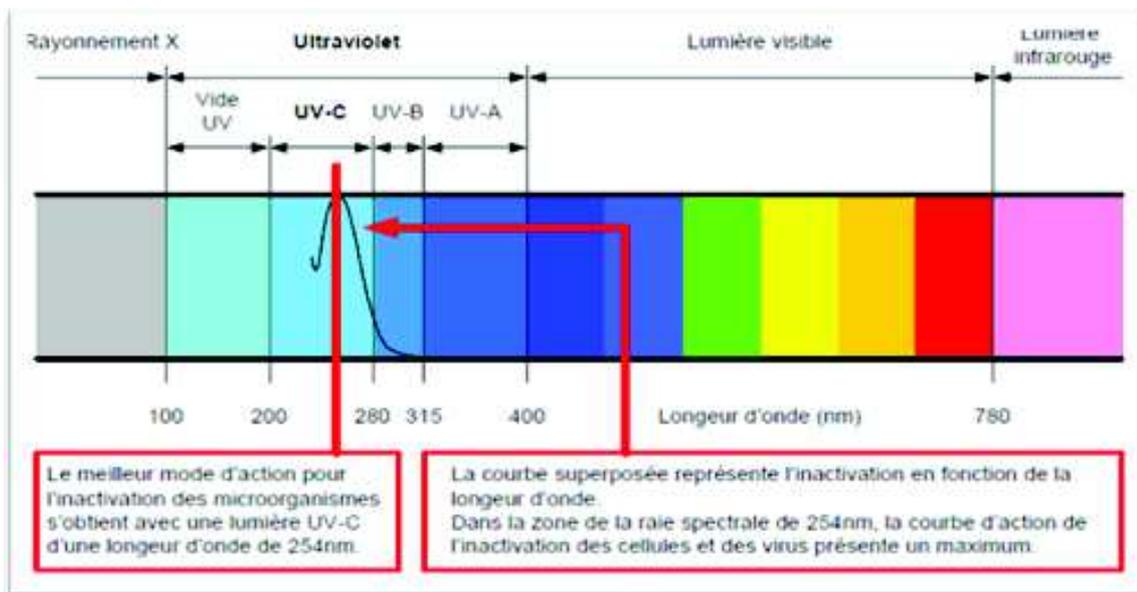


Figure II.2: Caractérisation de la lumière UV.

La particularité de la bande des UV-C est de présenter un effet germicide puissant, (optimum à 253,7 nm) (**Figure II.3**). Il faut également signaler la production d'Ozone (O₃) pour les rayonnements UV-C de longueur d'onde inférieure à 200nm (optimum à 185nm) (**Doona et al., 2010**).Faisant partie du spectre électromagnétique (lumière), il est ainsi possible d'en faire facilement la mesure en utilisant un posemètre gradué directement en $\mu\text{W.s/cm}^2$, mW.s/cm^2 ou J.s/cm^2 (**Rosset et Rosset, 1996**).

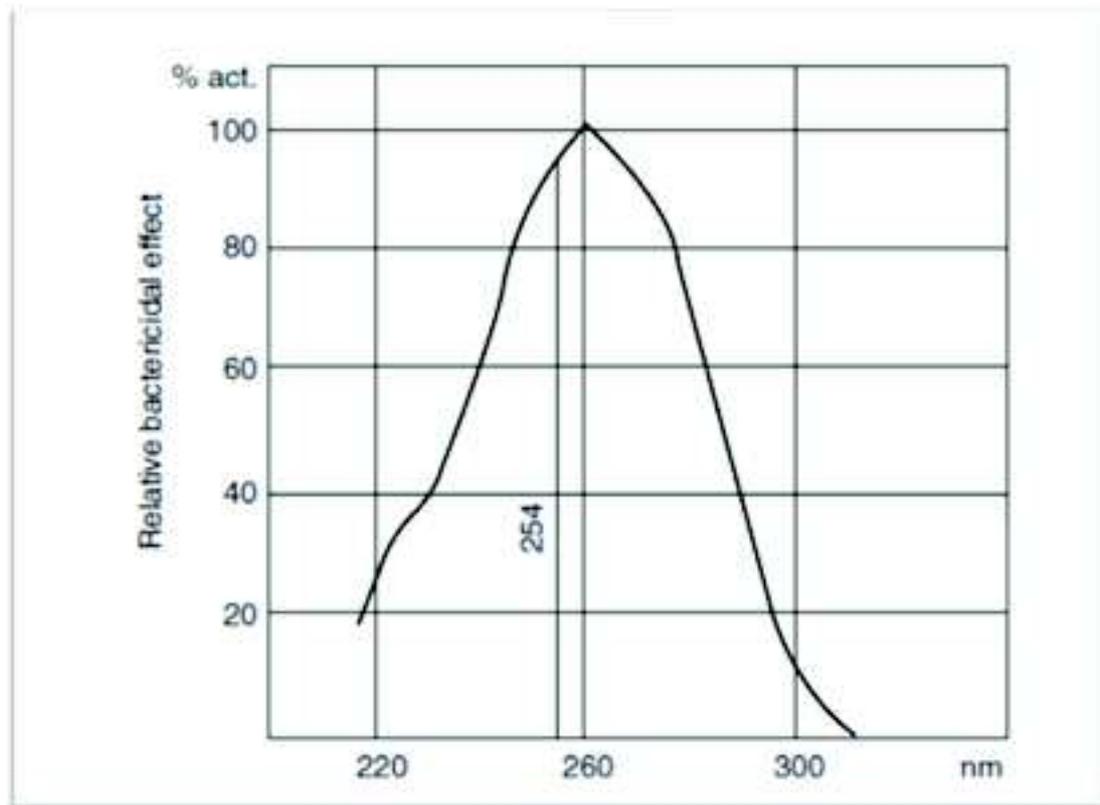


Figure II.3: Efficacité germicide de la lumière Ultraviolet
(Jun et Irudayaraj, 2009).

II.2 Actions générales des UV

II.2.1 Actions cellulaires

En raison de leur longueur d'onde élevée, au-dessous de 450nm et un quantum d'énergie de 3-5 eV, énergie suffisante pour exciter les électrons des molécules les rendant plus réactives. De manière générale, les réactions chimiques induites dans les microorganismes et les virus provoquent des problèmes métaboliques conduisant à des modifications physico-chimiques irréversibles des acides nucléiques, principalement de l'ADN (**Adams et Moss**, 2008).

Les rayonnements UV traversent la membrane cytoplasmique de la cellule, pénètrent dans le noyau et modifient la chromatine par effet photochimique. Les éléments de la reproduction sont ainsi inhibés et la division cellulaire bloquée, directement par modification génétique ou indirectement par erreurs de réplication. Si l'action est suffisamment prolongée ou renforcée, le noyau se dilate jusqu'à son propre éclatement et/ou celui de la cellule (**Rosset et Rosset**, 1996).

Deux stades successifs d'action sont à distinguer :

- *Effet bactériostatique* : La fonction de la réplication cellulaire est inhibée par dissociation des doubles liaisons instaurées des acides nucléiques du noyau.
- *Effet bactéricide* : Le rayonnement UV entraîne la désorganisation de la cellule par éclatement des membranes nucléaire et/ou cellulaire.

II.2.2 Actions sur les acides nucléiques

Par activation des électrons ou des doublets électroniques au niveau des molécules irradiées, les UV dissocient les doubles liaisons des acides nucléiques. Selon **Rosset et Rosset** (1996), les dommages causés par les UV aux bases azotées, constitutives des acides nucléiques sont les suivants :

- Formation de dimères : apparaissant principalement sur la thymine.
- Formation d'hydrates dans l'ADN : apparition rare du fait de la présence de liaisons hydrogènes.
- Dénaturation de la double hélice de l'ADN : même mode d'apparition que pour les dimères et les produits d'hybridation.

Les acides nucléiques absorbent de manière intense les UV avec un pic autour de 260nm, ce qui correspond au spectre d'absorption UV pour les bactéries. En effet, pour la plupart des espèces, l'effet bactéricide est maximum pour une longueur d'onde de 253,7 nm.

L'inactivation des bactéries est essentiellement liée à l'absorption des UV par l'ADN et à la dépolymérisation des bases pyrimidiques résultantes (**Figure II.4**). Ces dimères de thymine dénaturent la conformation de la double hélice et interfèrent sur le déroulement normal de la réplication cellulaire. Cependant, à la suite de l'exposition aux UV, les altérations cellulaires peuvent au niveau de l'ADN altéré, être réparées : ce phénomène est appelé *photoréactivation*.

Plusieurs études ont démontré la capacité des pigments de mélanine à protéger l'ADN de différents microorganismes contre les UV (**Geng et al.**, 2008; **Ruan et al.**, 2004). Des spores pigmentées d'espèces de *Bacillus* se sont révélées plus résistantes aux longueurs d'onde UV-A que des spores non pigmentées (**Moeller et al.**, 2005). En revanche, la résistance de ces différentes spores aux UV-C n'a pas prouvé de lien avec la pigmentation.

En comparaison avec l'ADN, l'absorption des UV par les protéines est, dans la plupart des cellules, de loin moins significative, bien que les protéines des virus soient des cibles importantes. Ceci est du principalement au faible taux d'absorption de la plupart des acides aminés des protéines ; seuls la tyrosine et le tryptophane présentent des pics d'absorption dans la région des 260nm mais ces deux acides aminés sont peu abondants dans la protéine.

L'effet des longueurs d'ondes UV, bien qu'incontestable, suscite des interrogations. Il semble que les différentes espèces de microorganismes ne soient pas sensibles aux mêmes gammes de longueur d'onde de la lumière. Les spectres d'absorption de ces bases sont très voisins avec de légères différences (**Figure II.5**). De ce fait, les acides nucléiques des divers microorganismes présentant des variations de leur composition en bases, leurs spectres d'absorption ne sont pas tous semblables (**Levy**, 2012).

Après leur décomposition, les bases donnent naissance à des composés issus de l'irradiation, appelés : *photoproduits* de l'ADN. Les conséquences biologiques des altérations de l'ADN par les UV sont de loin plus significatives que celles qui touchent l'ARN,

à l'exception des virus et des bactériophages pour lesquels l'ARN est l'unique matériel génétique (**Rosset et Rosset, 1996**).

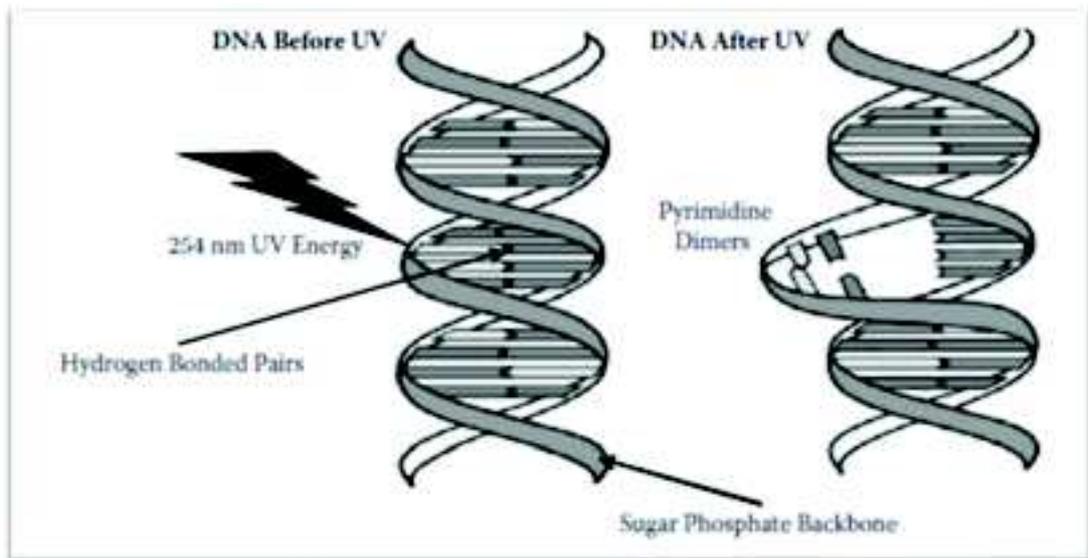


Figure II.4: Schéma montrant la structure de l'ADN avant et après absorption de photons UV

(Koutchma et al., 2009).

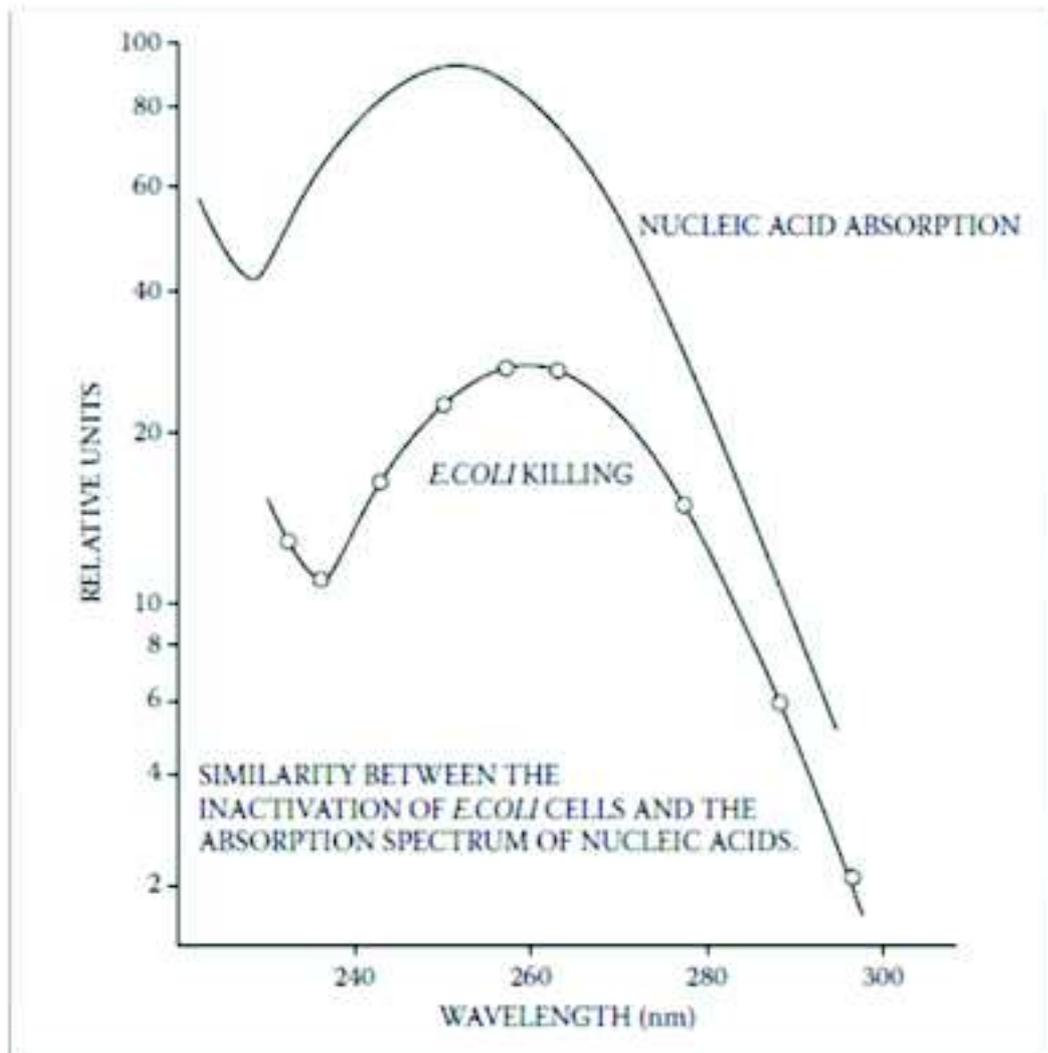


Figure II.5: Courbe d'absorption des UV par les acides nucléiques (Koutchma et al., 2009).

II.2.3 Réparation cellulaire

Du fait de la présence naturelle des UV dans la lumière, de nombreux organismes sont soumis continuellement aux UV. Il n'est donc pas surprenant que beaucoup d'entre eux soient capables de neutraliser les effets potentiels létaux des UV en réparant les dommages de leur ADN. Ces organismes présentent un avantage sélectif considérable sur les autres espèces incapables d'assurer cette réparation. **Rosset et Rosset** (1996) ont regroupé ces mécanismes en 3 catégories :

a) Altérations réversibles induites par les UV, exemple : *Photoréactivation* où les dimères sont réduits en monomères par action d'une enzyme active sous l'action de la lumière visible (310-480nm).

b) Substitution des nucléotides endommagés, exemple : *coupure –réparation* où une séquence est excisée puis resynthétisée correctement. Des enzymes sont également nécessaires, en absence de la lumière.

c) Combinaison des régions indemnes par réplication d'ADN ou post-réplication.

II.2.4 Paramètres influençant l'action des UV

II.2.4.1 Notion de dose

La dose est le produit de l'intensité du rayonnement (à la longueur d'onde germicide) reçue sur l'unité de surface, en un point donné, par le temps d'exposition. Les unités de dose sont exprimées en microwatts seconde par centimètre carré ($\mu\text{W.s/cm}^2$), en millivolt seconde par centimètre carré (mV.s/cm^2) ou encore en Joules par centimètre carré (J/cm^2) (**Jun et Irudayaraj**, 2009).

Notons que l'activité bactéricide dépend essentiellement de la dose et non de l'intensité de la lampe utilisée. La relation entre ces deux paramètres est donnée par la formule suivante :

$$D = L \times T$$

Où :

D est la dose de rayonnement reçue, en mW.s/cm^2 ; L l'intensité des rayons UV, en mW.s/cm^2 et T le temps d'exposition, en seconde.

Pour l'inactivation des microorganismes, un minimum de 400J/m^2 devrait être appliqué (**Doona et al.**, 2010).

La détermination des valeurs D des UV n'est pas réellement ou strictement importante, car les rayons UV peuvent être absorbés par un autre composé et n'avoir qu'une pénétration non- profonde (*exemple* : Le passage à travers 5cm d'eau claire réduit l'intensité des UV par 2/3).

Cet effet augmente avec la concentration des solutés et des matières en suspension (*exemple* : 90% de l'énergie incidente dans le lait est absorbée par une épaisseur de 0.1 mm). Cette pénétrabilité basse représente l'inconvénient majeur des UV et ne laisse ces derniers non- applicables à ce jour pour les Industries agro-alimentaires et à grande échelle (**Adams et Moss**, 2008).

II.2.4.2 Facteurs limitant

Coohill et Sagripanti (2008) définissent les principaux paramètres influençant l'action des UV (**Figure II.6**):

- En général :
 - La distance comprise entre la lampe et les microorganismes à détruire,
 - La nature et la concentration des microorganismes.
- Pour les microorganismes en suspension dans un liquide :
 - Le débit et la turbidité du liquide,
 - Le coefficient d'absorption du liquide pour les UV,
 - Les caractéristiques physicochimiques du milieu.

- Pour les microorganismes en suspension dans l'air ou sur un solide :
 - La nature, la taille et le nombre de particules véhiculant les microorganismes,
 - La température et l'humidité du milieu ambiant.

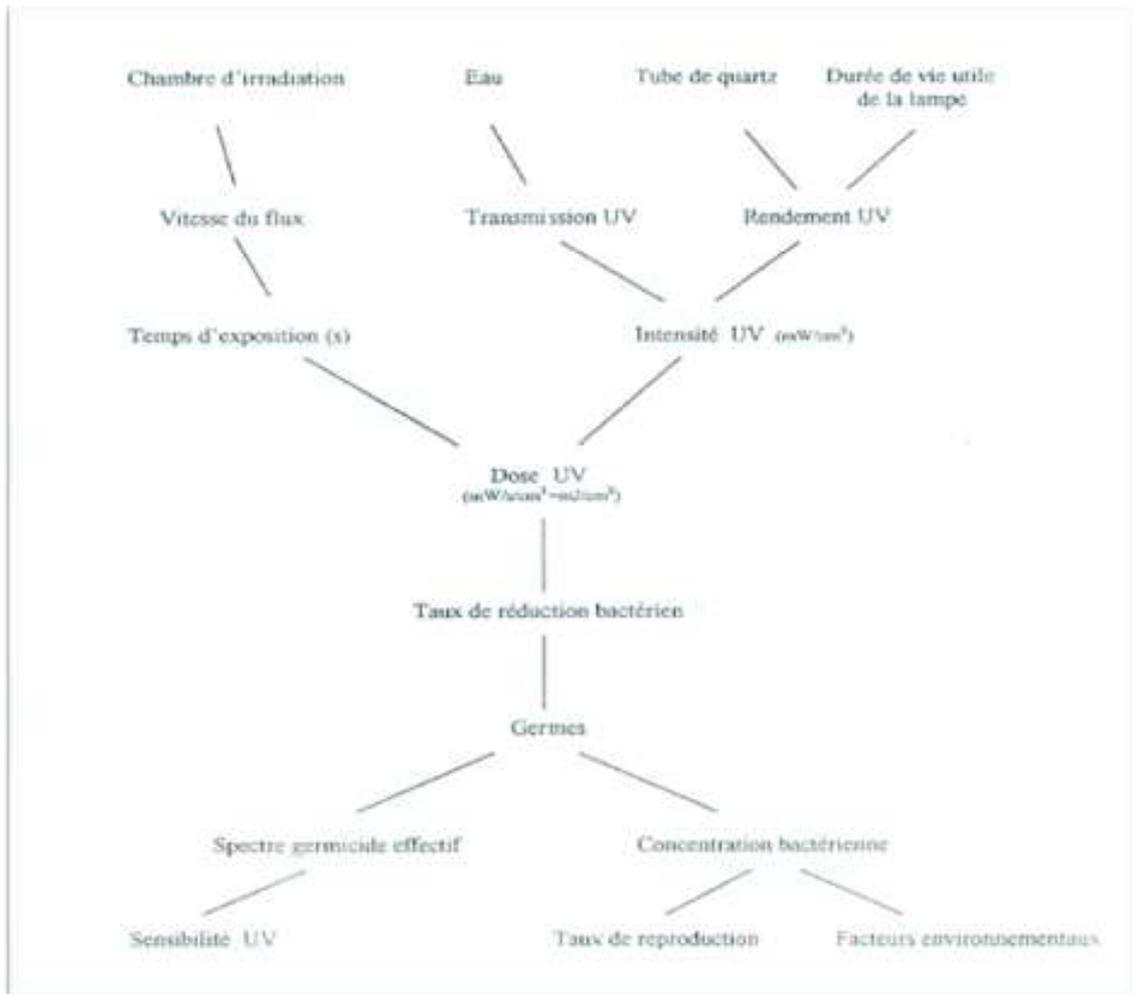


Figure II. 6: Exemple d'équipement haute pression industriel, Promatec, Belgique (Calders, 2009).

Coefficient d'absorption du milieu

L'action des UV décroît de manière exponentielle avec la profondeur de pénétration dans le milieu (loi de *Beer-Lambert*). Le coefficient d'absorption dépend de la couleur du milieu, de sa viscosité ainsi que sa turbidité, paramètre étroitement lié à l'importance de sa charge bactérienne (**Tableau II.1**).

D'une manière générale, les UV ne peuvent pénétrer qu'approximativement de 100micromètres seulement les matériaux de densité égale à celle de l'eau (**Tableau II.2**). Pour compenser cette difficulté, il est nécessaire d'augmenter les temps de traitement. Par ailleurs, il est à noter que la présence de solutés augmente le coefficient d'absorption. La coloration du milieu constitue un obstacle à la pénétration des UV (**Rosset et Rosset, 1996**).

Tableau II.1: Coefficients d'absorption de quelques liquides alimentaires (cm⁻¹) calculés a 254 nm

Eau distillée	0,007 à 0,01
Eau potable	0,02 à 0,1
Sirop clair	2à 5
Sirop foncé	20à 50
Lait	300

(Jun et Irudayaraj, 2009)

Tableau II.2: Profondeur de pénétration des UV selon la longueur d'onde dans le lait

Longueur d'onde (nm)	Profondeur de pénétration efficace (mm)
250	0,036
275	0,038
300	0,041

(Jun et Irudayaraj, 2009).

Interactions avec les surfaces

Certains résultats (**Woodling et Moraru**, 2005) évoquent plusieurs facteurs d'influence de la surface sur la décontamination. L'exemple de *B.subtilis* traité sur polystyrène et sur verre en est une bonne illustration. En effet, d'un point de vue microscopique, les deux surfaces présentent un profil très similaire, à savoir l'absence de failles et rugosités. Pourtant, la résistance des spores sur le verre est supérieure à celle sur plastique. Les propriétés optiques de la surface, peuvent avoir une incidence sur l'efficacité du traitement. Ainsi, d'après **Woodling et Moraru** (2005), une surface présentant une forte réflectivité provoquera une absorption de la lumière moins importante au niveau de la cellule. En fait le problème est sans doute plus compliqué. Il faudrait aussi tenir compte de la diffusion en surface et en volume et de la géométrie des microorganismes. L'adhésion des microorganismes aux surfaces inertes peut dépendre de l'hydrophobicité du matériau, de la composition du milieu de suspension, mais aussi du microorganisme. Elle peut être différente selon la phase de croissance des microorganismes testés, en raison des charges de surfaces différentes selon le stade. L'hydrophobicité plus ou moins marquée des microorganismes peut être à l'origine d'agrégations importantes, entraînant une meilleure protection face à l'illumination (**Levy**, 2012).

II.2.5 Avantages et inconvénients des UV

Ortega-Rivas (2012), **Dubourg et Lacouture** (2009) ainsi que **Rosset et Rosset** (1996) énoncent les avantages et les inconvénients des Ultraviolets comme suit :

II.2.5 1 Avantages

- Au niveau des produits traités
 - Absence de produit chimique à ajouter ou à remplacer,
 - Absence de modification physicochimique de l'eau,
 - Effet bactéricide instantané, non rémanent et spécifique,
 - Absence de rayonnement résiduel dans la production,
 - Absence de résidu radioactif, même après de très haut niveau d'exposition.

- Au niveau de l'installation :
 - Dispositif compact et facile à installer,
 - Faible investissement initial,
 - Grande souplesse d'utilisation dans le cadre industriel,
 - Mise en œuvre ne nécessitant pas de surveillance particulière,
 - Possibilité d'automatisation par adjonction d'un système de monitoring,
 - Maintenance relativement faible (remplacement des lampes),
 - Absence de risque lié au stockage des produits chimiques.

II.2.5.2 Inconvénients

- Au niveau des personnes exposées :
 - Risque pour les personnes non-protégées : apparition possible d'érythème et de conjonctivite.
- Au niveau du produit traité :
 - Lait : capacité de caillage détériorée,
 - Possibilité de modifications minimales des caractères organoleptiques (saveur, flaveur) de certains liquides,
 - Réactions d'oxydation variables selon la nature de la denrée traitée.
- Au niveau des installations :
 - Protection nécessaire du personnel,
 - Situation de l'installation du traitement : celle-ci doit être aussi proche que possible du point d'utilisation.

II.3 Action des microorganismes

II.3.1 Notion de dose létale (D10)

L'objectif d'un dispositif à UV est de mettre hors de combat ou de tuer des microorganismes cibles en leur délivrant une dose létale de rayonnement germicide.

Pour chaque microorganisme correspond un quantum donné d'énergie UV assurant sa destruction. Ce seuil est appelé « *dose létale ou D₁₀* » qui correspond à la réduction d'un logarithme du nombre de germes rapportés au cm² ou au ml, c'est-à-dire la dose à laquelle 10% des microorganismes restent encore vivants.

En général, les dispositifs à UV doivent pour être efficaces détruire au moins de 99,9 % de la population microbienne, correspondant à 4fois la D₁₀.

II.3.2 Sensibilité des microorganismes

La viabilité des microorganismes et virus soumis aux UV dépend de la capacité de leur ADN et ARN à rester intact. Leur résistance varie en fonction de la forme et de la complexité de leurs composants intracellulaires, véritables éléments de protection.

La dose létale est différente pour chaque microorganisme, ainsi en prenant la D₁₀ d'*Escherichia coli* (3mWs/cm²) comme unité de référence, nous pouvons distinguer la résistance croissante aux UV, suivant le **Tableau II.3**.

Tableau II.3: Résistance des bactéries selon la référence *E. coli*

Bactérie	Résistance
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	2
Virus	1 à 4
Spores de <i>Bacillus</i>	4 à 10
Rhizopus	37
Aspergillus	44

(Rosset et Rosset, 1996).

La résistance des microorganismes aux UV est largement déterminée par leur capacité à réparer les dégâts causés par les rayons. En général, Les virus, cocci, formes végétatives bactériennes sont plus facilement détruits que les levures, les moisissures et les spores. Les bacilles Gram négatifs sont plus sensibles aux UV, suivis par les cocci Gram positifs et les spores bactériennes. Selon le modèle suivant : Gram - < Gram+ ~Levures <Spores bactériennes < Spores de moisissures < Virus (**Adams et Moss**, 2008).

Aussi les colonies incolores sont plus facilement détruites que les colonies colorées (**Montville et Matthews**, 2008).

Comme pour les autres méthodes de désinfection, le degré d'inactivation d'une population est caractérisé par la courbe de survie, c'est-à-dire l'évolution du nombre de cellules survivantes en fonction du temps de traitement.

La courbe d'inactivation est sigmoïdale, avec un plateau initial du à la phase d'atteinte du microorganisme en réponse à l'exposition aux UV, suivie par une phase en queue (Tailing) due à la résistance aux UV ou aux composés expérimentaux tels que : les solides en suspension qui pourraient bloquer les rayonnements. La littérature reste insuffisante pour développer une cinétique d'inactivation microbienne après exposition aux UV. Cependant, les études ont rapporté jusqu'à 4logs de réduction pour divers microorganismes traités à 254nm. La réduction est en rapport direct avec l'exposition aux UV (J/cm²) (**Anonyme**, 2011).

Mise à part, la résistance intrinsèque, d'autres facteurs interviennent dans l'efficacité des UV, à savoir :

- Le type de milieu de croissance des microorganismes,
- La température du milieu,
- La phase de croissance du microorganisme.

Il est reconnu que la présence d'un milieu organique riche comme le sérum, le lait et les produits à base d'œufs peuvent entraîner des effets protecteurs.

Quelques microorganismes produisent des toxines, incluant endotoxines et exotoxines. Les UV ont un effet limité sur celles-ci mais l'exposition prolongée peut réduire la concentration de ces toxines (Kowalski, 2009).

II.4 Mode d'émission des UV

II.4.1 Techniques

Le traitement UV peut se faire en batch, en continu ou en pulsation. Les UV continus sont émis par des lampes à mercure qui émettent continuellement des photons UV et sont appelés « ondes UV continues » (Figure II.7). Alors que les UV pulsés représentent une technologie moderne, utilisant des pulsations de courte durée d'un flash polychromatique de grande intensité, riche en UV-C, émis par une lampe xénon, on parlera alors d'« UV pulsés ou de lumière pulsée » (Figure II.8) (Cullen *et al.*, 2012).

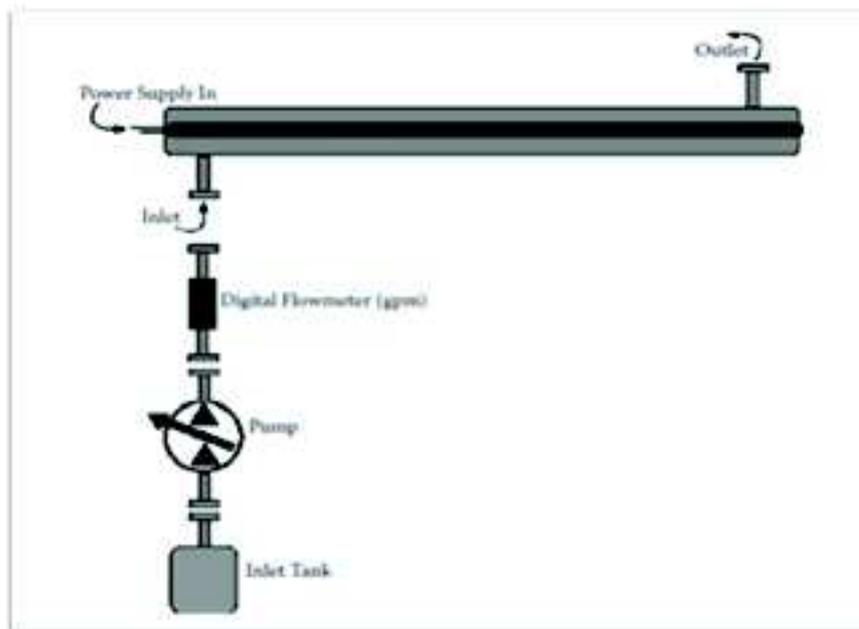


Figure II.7: Schéma d'un système simplifié de traitement UV (Koutchma et al, 2009).

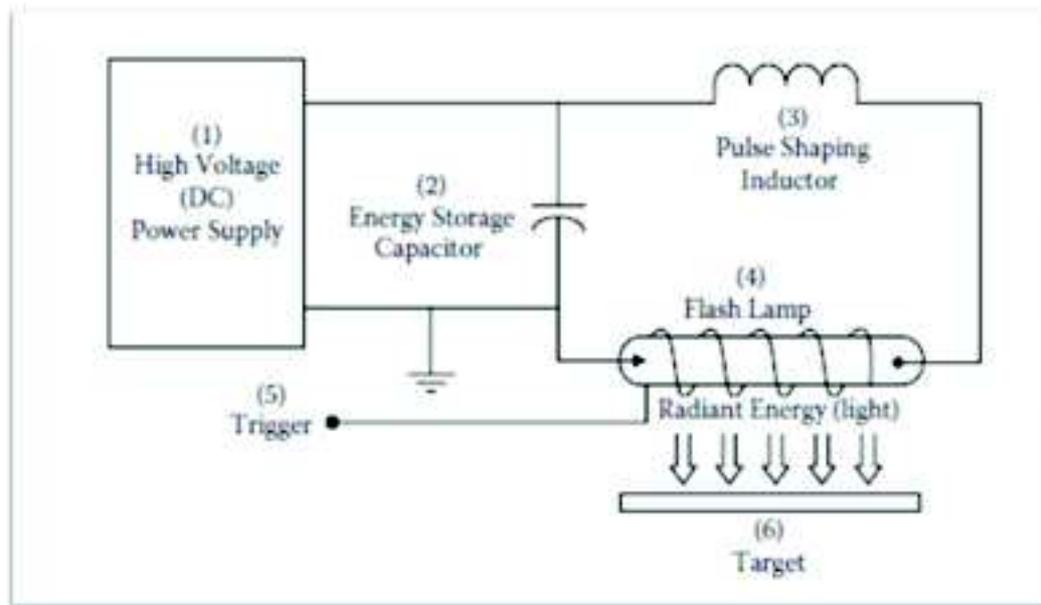


Figure II.8: Schéma d'un système de Lumière pulsée

(Koutchma et al, 2009).

II.4.2 Sources d'émission des UV

Les rayonnements UV sont produits par des lampes mercure à basse et moyenne pression, qui consistent en un mélange entre mercure et un gaz inerte (souvent Argon) en vapeur confiné dans un tube en quartz ou un transmetteur UV (**Figure II.9**). Le tube contient des électrodes aux deux extrémités faites en Tungstène et autres métaux, aidant à la formation d'un arc électrique.

Quand un haut voltage est appliqué à travers l'électrode, l'arc électrique excite le mercure vapeur, qui à son tour émet des UV retournant à un niveau d'énergie plus bas. L'Argon aide à démarrer la lampe et diminuer les pertes thermiques (**Demirci et Ngadi, 2012**).

Selon **Dubourg et Lacouture** (2007), il existe plusieurs types de lampes à vapeurs de mercure qui possèdent chacun son spectre d'émission (**Figures II.10 et II.11**), on citera :

- *Lampes à vapeur de mercure basse pression* (10^{-3} à 10^{-5} bars) : constituent la source artificielle d'UV-C la plus efficace. Leurs arcs produisent des radiations monochromatiques à environ 254 nm.

- *Lampes à vapeur de mercure haute pression* (10^{-1} à 20 bars) : conviennent pour les débits importants de produits à traiter, mais leur rendements est inférieur à leurs précédentes. Leurs arcs produisent des radiations polychromatiques dans l'UV et le visible.

Pour un procédé qui ne présente aucun danger, la Food Drug Administration (FDA) recommande l'utilisation des lampes mercure à basse pression qui émettent 90% à 253,7nm (**Demirci et Ngadi, 2012**)

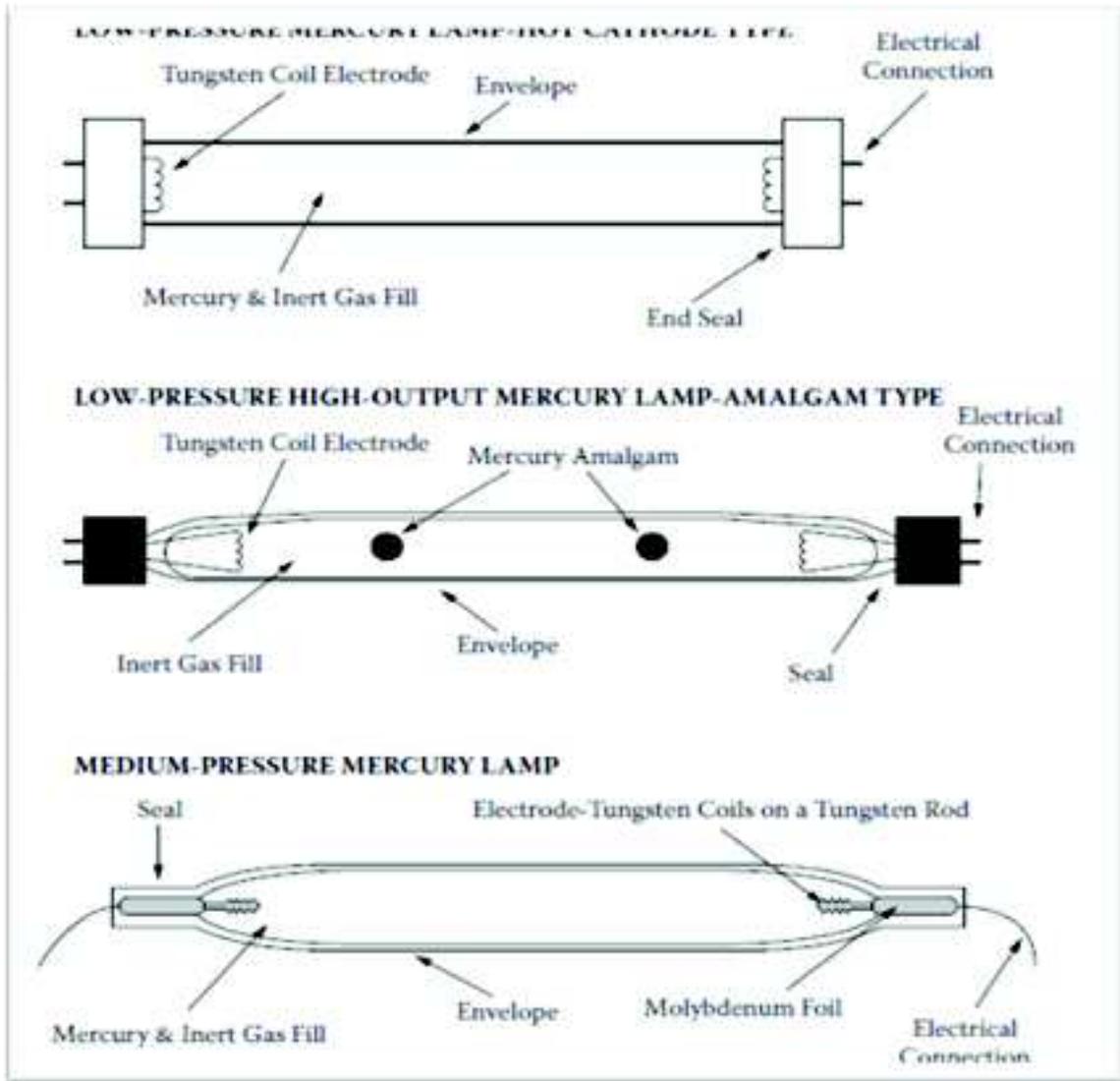


Figure II.9: Schéma de quelques lampes UV à mercure (Koutchmaet al., 2009).

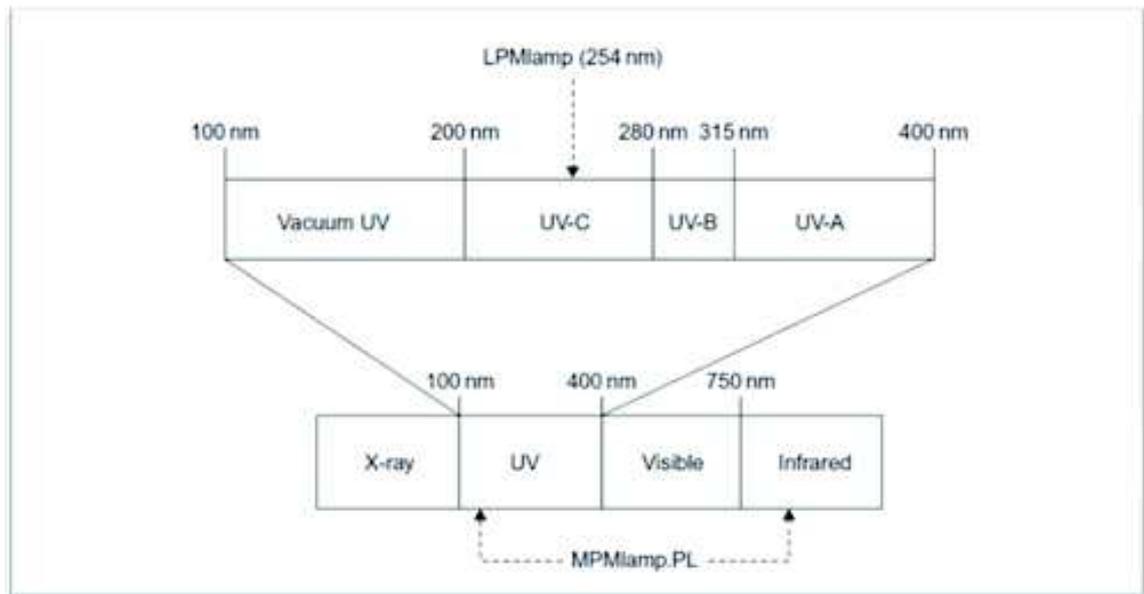


Figure II.10: Spectre d'émission des différentes lampes UV

(Cullen et al.,2012).

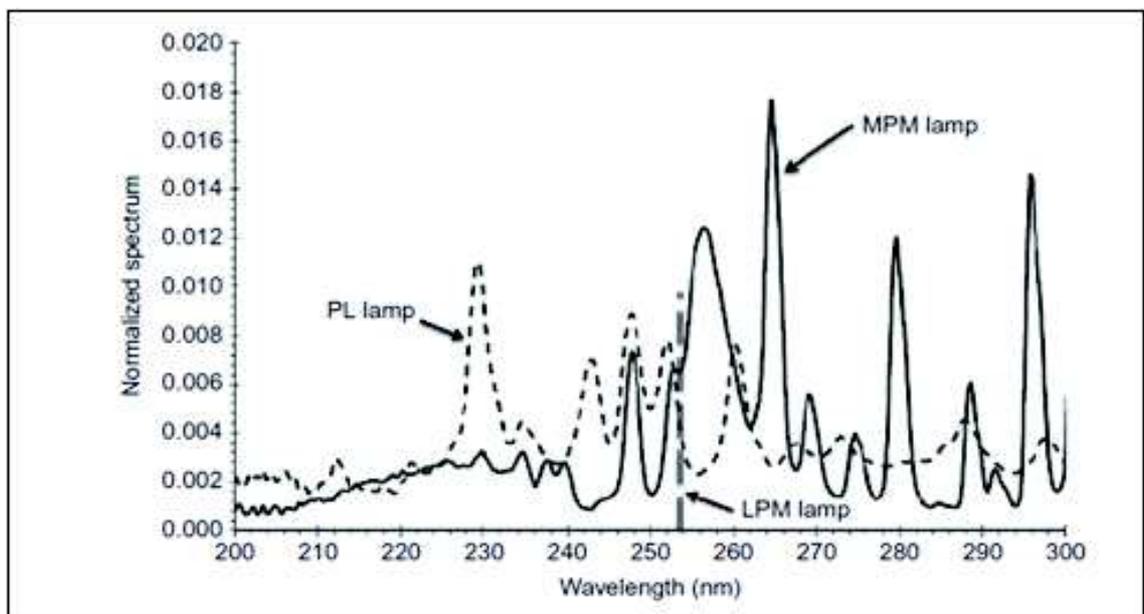


Figure II.11: Spectre d'émission des différentes lampesUV

(Cullen et al.,2012).

II.4.3 Installation de traitement UV

II.4.3.1 Caractéristiques des installations

- Une installation de traitement UV comprend :
 - Une chambre de réaction,

- Une ou plusieurs lampes germicides entourées chacune d'une gaine tubulaire en quartz ou en silice,
 - Un coffret refermant les composants électriques,
 - Un hublot.
- Les principaux paramètres à prendre en compte :
 - Le dimensionnement de l'installation : régit par la loi de Beer- Lambert, à savoir :

$$D = \left(\frac{P}{S}\right)e^{-k \cdot x \cdot t}$$

Dans laquelle : D est la dose UV, P, la puissance germicide entourant la lampe et T, le temps d'irradiation.

- La spécificité de la contamination microbienne à traiter,
- Le niveau demandé de qualité final du produit traité.

II.4.3.2 Régulation et automatisation

Quelques dispositifs sont à noter :

- Moniteur UV : qui régule le rendement de la lampe, détecte les faiblesses et les diminutions,
- Régulateur de puissance UV, par dispositif électronique.

II.4.3.3 Utilisation de réacteurs pour les aliments liquides

D'après **Cullen et al.** (2012), on note l'existence de plusieurs réacteurs utilisés pour les aliments liquides

Réacteurs annulaires

Le liquide est pompé dans l'espace formé de deux cylindres stationnaires et concentrique, en une couche très fine (<1mm), en écoulement laminaire.

Exemple : Le pilote Cider sure reactor (**Figure II.12**), Pure Uv/Sure pure reactor pour le traitement des jus de fruits, cidre et nectars (USA).



Figure II.12: Réacteur Cidersure 3500

(Cullen et al., 2012).

Mélangeurs statiques

Ils consistent en une série d'hélices alternatives avec 180° de rotation, juxtaposées à 90°. Avec le but de mélanger, renverser, homogénéiser, exposant ainsi les microorganismes au maximum de rayonnements (**Figure II.13**).

Exemple : Latros of Dundee (Ecosse)

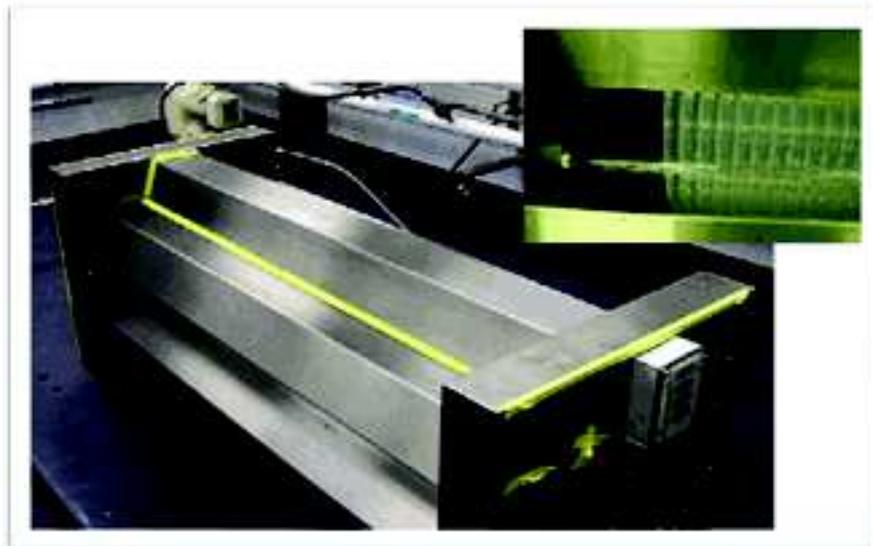


Figure II.13: Mélangeur statique à 24 lampes UV

(Cullenetal., 2012).

Mélangeurs dynamiques

Ils possèdent deux cylindres, le premier externe stationnaire et le deuxième interne en rotation, conduisant à l'instabilité du fluide.

Exemple : Taylor- Couette (Canada) (**Figure II.14**).



Figure II.14: Réacteur Taylor-Couette

(Cullen et al, 2012).

II.4.3.4 Coût des installations UV

Plusieurs facteurs sont pris en considération pour déterminer le cout d'une installation UV, on citera : l'énergie utilisée, le remplacement des lampes et des tubes, la maintenance, et le nettoyage des arcs. Quelques facteurs sont à éliminer : achats de produits chimiques, transports, stockages... (**Demirci et Ngadi, 2012**).

II.5 Applications dans les industries agro-alimentaires

II.5.1 L'air

II.5.1.1 Généralités

Dans les industries agro-alimentaires, les UV sont utilisés pour la désinfection de l'air afin de prévenir la contamination des produits par les microorganismes aéroportés.

Le risque de contamination n'est pas seulement présent tout le long de la production des denrées alimentaires, mais également lors de leur emballage, stockage et distribution. Ainsi les UV présentent l'avantage de pouvoir procurer une protection pour l'air et les surfaces, à tous les stades de la chaîne de production.

II.5.1.2 Les différentes applications

Selon **Koutchma et al .**, (2009), **Rosset et Rosset** (1996), les applications se résument comme suit :

- Industrie laitière
 - Désinfection de l'air,
 - En fromagerie, en chambre de pousse.
- Industries des viandes
 - Chambres froides des abattoirs, pour prolonger le temps de stockage.
- Boulangerie-Pâtisserie
 - Chambres froides et lieu de stockage,
 - Baguette de pain, réduisant les contaminations post- cuisson.
- Restauration collectives
 - Locaux de préparation et de cuisine,
 - Fruits frais fraîchement coupés.

II.5.2 Applications aux liquides

II.5.2.1 Généralités

L'utilisation des UV pour le traitement des liquides n'est pas encore généralisée et fait encore la cible de recherche, ceci est dû à la faible pénétration des rayonnements sur les matières sub-opaques tels que les liquides alimentaires. Cependant, le développement de nouveaux réacteurs avec des paramètres optimisés utilisant l'écoulement d'une très fine couche de fluide permettant la pénétration des rayons UV (**Cullen et al .**, 2012).

D'après **Rosset et Rosset** (1996), la quantité de rayonnement UV requise pour détruire des microorganismes présents dans un liquide donné dépend du pouvoir de transmission des UV dans ce liquide.

Pour les liquides absorbants, l'intensité germicide décroît avec la profondeur de la pénétration, selon la formule :

$$E = E_0 e^{-\alpha x}$$

Où : E_0 représente l'intensité incidente, E , l'intensité à la profondeur x et α , le Coefficient d'absorption.

La profondeur de pénétration efficace pour une destruction à 90% varie entre 3m pour l'eau distillée limpide, 12cm pour l'eau de boisson et 0.5mm pour le lait.

II.5.2.2 Avantages

- Absence de modification sensible au pH et de la composition du liquide traité,
- Absence de rémanence,
- Absence d'additifs,
- Possibilité d'une désinfection immédiate et sûre de substances à risque comme le sont les boissons.

II.5.2.3 Effets du traitement sur les liquides

Dubourg et Lacouture (2007) ont résumé les effets des rayonnements UV appliqués pour le traitement des liquides alimentaires comme suit :

- Production de furanes à partir de glucose, mais cela reste très négligeable (>1ppb),
- Brunissement non enzymatique pour les produits contenant des protéines et des sucres, mais ceci n'a pas été remarqué pour le lait,
- Effet potentiel sur la capacité antioxydante (Effet photochimique bénéfique),
- Changements dans les macromolécules (Modification conformationnelles),
- Dégradation susceptible de la couleur (Sensibilité des caroténoïdes aux UV),
- pH et Degré Brix non affectés.

Aussi, le traitement aux rayonnements UV a des effets néfastes sur les aliments liquides, tels que décrit par **Jun et Iradayaraj** (2009) :

- Dépolymérisation de l'amidon,
- Formation de radicaux lipides, superoxydes et peroxyde d'hydrogène; ces peroxydes pourraient affecter les graisses solubles, les vitamines et les composés colorés, conduisant à des pertes en qualités nutritionnelles et / ou des décolorations,
- Peroxydation des acides gras insaturés,
- Dénaturation des enzymes et des acides aminés,
- Dégradation des vitamines surtout A, B₂, et C par photodégradation.

II.5.2.4 Exemples d'application

Cullen et al., (2012) ont divisés les liquides alimentaires pouvant être traités en 3catégories :

- Les Liquides,
- Les émulsions,
- Les suspensions.

Ces trois catégories sont détaillées dans le **Tableau II.4**:

Groupe de fluides	Propriétés			Exemples
	Définition	pH	Transparence	
Liquides	Homogènes, pompables Sans solides ni particules	Très acides pH<3,5 Acide 3,5<pH<4,6 Peu acide pH>4,6	Semi-transparents Transparents	Jus de fruits: pomme, raisin, pastèque...
Emulsions	Mélange de deux liquides non-miscibles ou l'un est dispersé dans l'autre	Peu acide pH>4,6	Opaque	Lait, œufs liquides Blancs d'œufs...
Liquides à particules	Liquides hétérogènes avec des solides en suspension	Très acides pH<3,5	Opaque +Particules	Jus de fruits et de légumes,

Tableau II.4: Classification des liquides traitables par UV

(Cullenet al., 2012).

Rosset et Rosset (1996) ont donné les principales applications des UV pour les liquides :

- Traitement des eaux : eau potable, eau de process (refroidissement, rinçage, saumure, blanchiment, fabrication...)
- Sirops : s'ils sont suffisamment concentrés, ils peuvent s'auto protéger contre certains microorganismes, leur pression osmotiques élevée s'oppose à la multiplication de nombreux germes. Toutefois, ils peuvent héberger des levures et moisissures, qui peuvent provoquer une fermentation et une flaveur indésirables, ce qui peut être facilement évité par un traitement UV.
- Lait : En raison des caractéristiques physiques (charge, trouble, coloration) du lait, l'effet assainissant des UV seuls est limité, et des durées de traitement élevées, pour parvenir à des résultats satisfaisant. L'association se fait avec des Infra Rouges ou un traitement thermique (température supérieure à 55°C) et arrive à détruire les bactéries mais reste insuffisante pour les formes sporulées.

II.5.3 Applications aux surfaces et aux solides

II.5.3.1 Généralités

Le succès de la désinfection de surface dépend en grande partie de l'aspect de surface du matériau à traiter. En effet, les UV n'inhibent que les microorganismes atteints, la totalité de la surface doit être exposée y compris les recoins où les microorganismes sont protégés.

En pratique, la décontamination des emballages et des denrées solides est à conduire de façon à avoir un rayonnement direct intense, l'installation des lampes doit se faire à une distance relativement faible de la surface à traiter (**Figure II.15**).

II.5.3.2 Emballages

Les microorganismes contaminant les emballages sont essentiellement des moisissures. Il est à noter que la résistance des spores de moisissures aux UV en raison de la présence de pigment dans leur paroi, ceci limitant la pénétration des UV donc leur efficacité.

Cependant, les UV sont intégrables à différentes étapes : formage, remplissage, scellage aseptique...

II.5.3.3 Denrées alimentaires

On note l'application des rayonnements ultraviolets sur la surface des carcasses de viande et pour les poissons, et des patates douces, mais il n'y a pas d'application pour les fruits et légumes pigmentés.

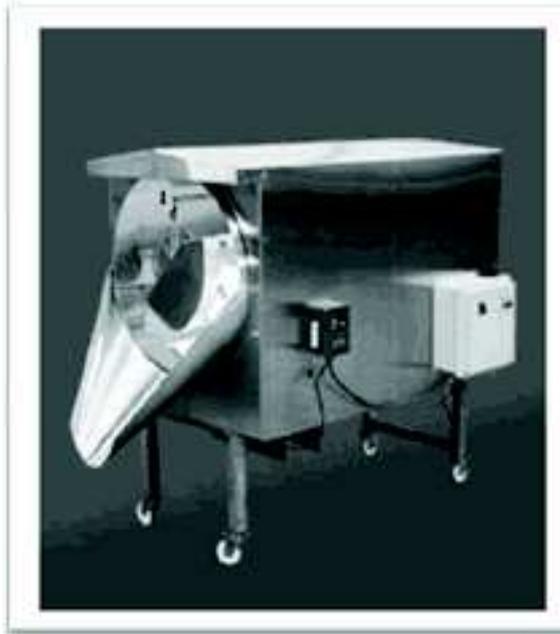


Figure II.15: Machine à décontamination des surface utilisant la lumière UV-C
(Koutchma et al., 2009)

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1 Préparation du lait

Le lait utilisé pour cette expérimentation est un lait commercial en pack de 1 litre, totalement écrémé (0.1 % de matière grasse). Le lait est disponible dans les épiceries de proximité et dans les grandes surfaces, avec une date de fabrication récente. Une fois acheté, il est conservé au réfrigérateur à 4°C pendant 5 jours après sa première utilisation. Avant chaque traitement, le lait est entreposé à température ambiante, (□25°). La stérilité du lait écrémé UHT est vérifiée à chaque traitement, en recherchant la charge bactérienne aérobie totale sur le milieu PCA (Plate Count Agar) et l'absence totale des bactéries testées dans le lait sur leurs milieux respectifs.

III.2 Cultures testées

Le lait a été inoculé par 3 souches bactériennes (**Tableau III.1**) à savoir :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, des laboratoires Envirozone, Alger ;
- *Escherichia coli* ATCC 25922 du laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital de Birtraria, Alger et;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 du laboratoire de Microbiologie de Saidal, El Harrach, Alger.

Les milieux de culture utilisés sont spécifiques pour chaque bactérie selon leurs exigences (**Tableau III.2**) et sont préparés à partir de milieux déshydratés commercialisés, stérilisés puis coulés en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Une fois séchées, ces dernières sont conservées au frais (0-2°C) et à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant un mois au maximum. Ces milieux coulés en boîtes de pétri sont ensuite testés pour vérifier l'absence de toute contamination en les incubant pendant 24h à 37°C. Aucun germe ne doit pousser à la fin de ce délai. Les souches bactériennes sont conservées dans leur milieu spécifique en boîtes de pétri au réfrigérateur à 4°C pendant un mois au maximum. A chaque expérimentation, une colonie pure de ces souches sont repiquées et mise en culture dans du bouillon enrichie pour la préparation de l'inoculum (voir détails dans la section III.4).

Bactérie	ATCC	Gram	Famille	Caractéristiques	Milieux de culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococaceae	Coques immobiles en amas aéro-anaérobies, occasionnellement pathogène, produisent une toxine, Thermorésistante, communs dans les intoxications alimentaires,	Chapman
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	Enterobacteriaceae	Egalement appelé "Colibacille", Coliforme fécal, aérobie, Associé à divers pathologies Non-diarrhéique et utilisée Comme souche standard.	VRBG (Violet Red Bile Agar Glucose)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	Aérobies strictes, ubiquitaires, Communément appelé "Pycocyanique", non sporulé, très mobile grâce à un cil polaire, produit des substances diffusibles à effets toxiques	VRBG

Tableau III.1: Liste et caractéristiques des microorganismes utilisés.

Milieux		Avant Utilisation	Après utilisation	Lecture
Milieu Général Commun	PCA (Plate Count Agar)			Colonies jaunes
Milieux spécifiques	Chapman			Colonies entourées d'un halo jaune (Mannitol +)
	VRBG (Violet Red Bile Glucose)			Colonies rose-rouges entourées d'un halo rouge (Lactose+)

Tableau III.2: Liste et aspects des milieux utilisés.

III.3 Traitements UV-C

Les traitements du lait par les UV- ont été réalisés en utilisant une chambre de traitement conçue par notre équipe de recherche, inspirée par **Palgan et al.**, (2011), représentée par un parallélépipède de dimensions (1m de longueur, 90cm de largeur, 70cm de hauteur) fabriqué en acier inoxydable couvert d'aluminium alimentaire dont la face est une porte coulissante en plexiglas de 2 cm d'épaisseurs dotée d'une poignée et s'ouvrant vers le haut (**Figure III.1**). Un système de ventilation a été installé d'un côté de la chambre pour prévenir toute augmentation de température due aux radiations UV-C.

La chambre de traitement est subdivisée en plusieurs étages, permettant ainsi plusieurs niveaux de traitement, représentés par 4 distances différentes de la source lumineuse, à

savoir: 5, 15, 25 et 45 cm et le traitement à chaque étage est appliqué sur une plaque en aluminium alimentaire pour éviter la contamination du lait à traiter.

Les rayons UV-C ont été émis par trois lampes UV germicides (référence : G8T5/0F, 8W, 56 V, Sylvania Osram, Denver, MA, USA), en verre transparent, opérant efficacement à température ambiante, émettant 80% de leur énergie en UV-C avec un pic à 253,7 nm, sans production d'ozone (**Figure III.2**). Ces trois lampes sont montées en série et disposées en haut de la chambre de traitement. Avant chaque utilisation, elles devaient être stabilisées et donc allumées une heure avant le début du traitement pour stabiliser l'intensité des rayonnements UV-C.

La dose des UV-C émis a été déterminée par la formule suivante :

$$D = I_0 \cdot t$$

Où ; D : est la dose d'UV-C délivrée (mJ/cm^2), I_0 , l'Intensité des UV-C émis à la surface de traitement (mW/cm^2) et t, le Temps de traitement (s).

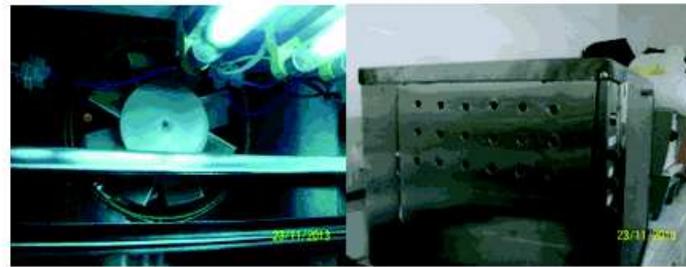
La variation des rayonnements durant le traitement variait de 113 à $339 \text{ J}/\text{cm}^2$, selon la hauteur entre les lampes UV et le lait à traiter (5, 15, 25 et 45 cm), et le temps d'exposition ou de traitement (5, 10 et 15 minutes).

La température dans la chambre de traitement a été mesurée et contrôlée avant et après traitement grâce à thermomètre à mercure installé à l'intérieur même de l'enceinte. La température dans l'enceinte était maintenue à température ambiante de l'ordre de $26.5 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant toutes les expérimentations.



(a)

(b)



(c)

(d)

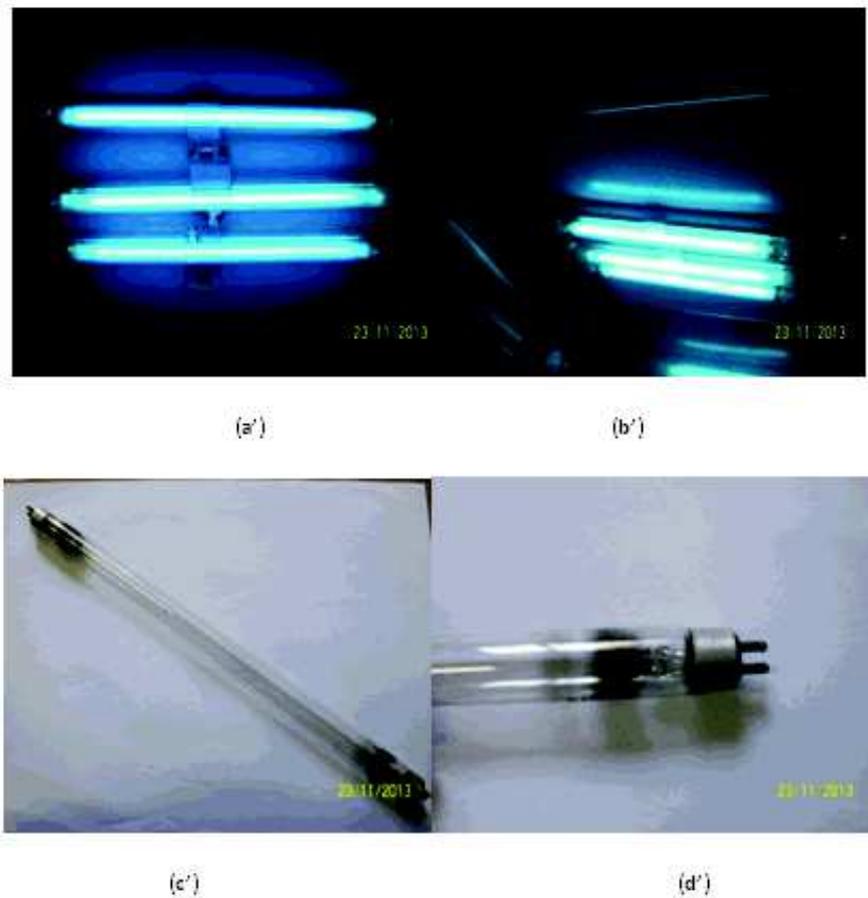


(e)

(f)

(a) Chambre de traitement vue de face, (b) Chambre de traitement ouverte, (c) et (d) système de ventilation, (e) Différents étages, (f) Espace de contrôle.

Figure III.1: Photos représentant la chambre de traitement UV.



(a') et (b') Lampes UV disposées en série, (c') et (d') Lampe UV-C.

Figure III.2: Photos représentant les lampes germicides UV-C utilisées.

III.4 Opérations effectuées

- **Revivification** : Les bactéries sont revivifiées dans des tubes coniques de 15 ml contenant un milieu nutritif (BHIB : Brain Heart Infusion Broth). Les microorganismes sont ensuite incubés à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à la phase de croissance (environ 18 à 24Heures). Cette étape est appliquée pour les trois bactéries testées dans cette étude.
- **Inoculation** : A la fin de la période d'incubation, les tubes seront centrifugés pendant 15minutes à 3000 tours /min Les culots formés sont ensuite lavés avec de l'eau physiologique, homogénéisés au vortex, puis centrifugés et lavés une deuxième fois. Par la suite, ce culot est mis en suspension dans 2 à 3 millilitres de lait écrémé et rassemblés dans un même contenant pour représenter un inoculum d'à peu près

8. 10^9 CFU/ml. Cette procédure est similaire et répétitive pour les trois souches bactériennes et pour chaque expérimentation.

- **Traitement** : Avant traitement, 2ml de chaque suspension est prélevé puis étalé dans une boîte de Pétri de 90mm de diamètre, s'assurant de la couverture totale de la boîte par le produit, obtenant ainsi 1mm d'épaisseur. Ce même volume est immédiatement soumis aux rayonnements durant des temps variables de 5, 10 et 15minutes sous les lampes UV-C, plaçant la boîte de Pétri au centre du plateau à des distances des rayonnement UV-C de 5, 15, 25 et 45cm (**Figure III.3**).
- **Analyses microbiologiques** : Après chaque traitement, 0.1 ml d'échantillon traité est dilué and 0.9 ml d'eau physiologique stérile, obtenant ainsi une dilution de 10^{-1} .Après homogénéisation au vortex, 0.1 ml de la solution précédente (10^{-1}) est ensuite dilué dans 0.9 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution 10^{-2} . Cette opération de dilution est répétée ensuite 6 fois jusqu'à obtention de la dilution 10^{-8} (**Figure III.4**).
- L'énumération des colonies est réalisée en inoculant 0.1 ml de la dilution appropriée, répétée en triplicata par étalement en surface à l'aide d'un râteau sur un milieu général (Plate Count Agar) et milieux sélectifs correspondant à chaque bactérie (Chapman pour les staphylocoques et Le Violet Cristal, Rouge neutre, Bile Glucose pour les deux autres bactéries) (voir **Figure III.5**)
- Les boîtes de Pétri inoculées sont par la suite incubées à 37°C pendant 24Heures. Les colonies formées sont comptabilisées et une moyenne est prise en compte en Unité Formant Colonie par millilitre (UFC/ml).

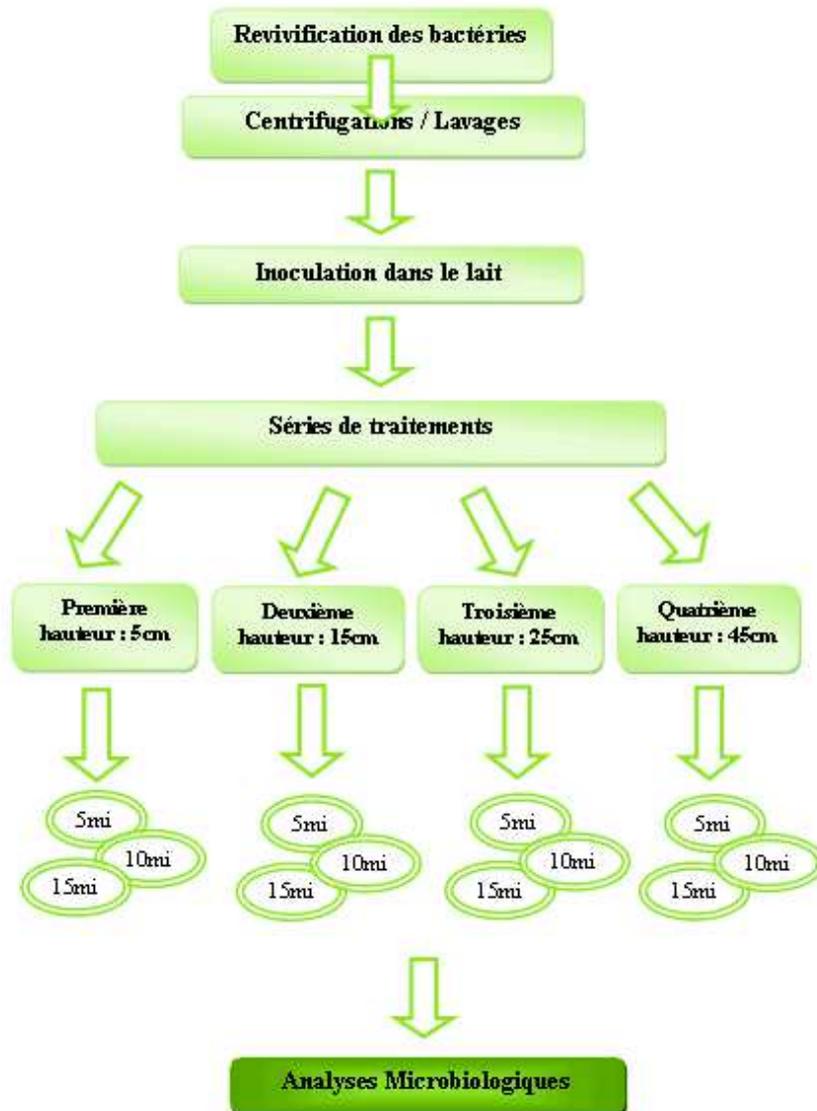


Figure III.3: Opérations effectuées avant les analyses microbiologiques.

Inactivation par rayonnements ultraviolets de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 9027) inoculés dans du lait écrémé

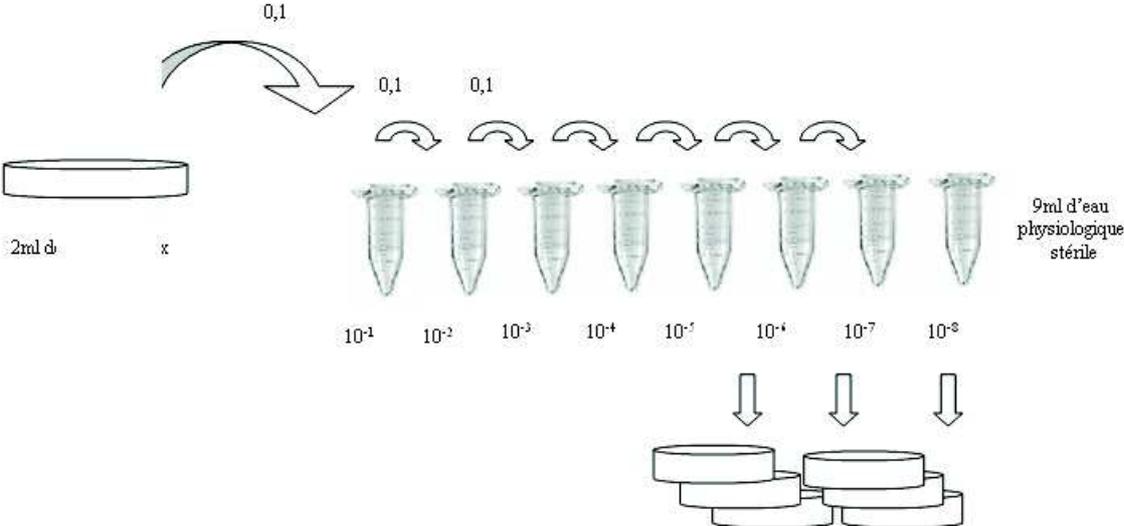


Figure III.4: Techniques de dilutions du lait traité aux UV-C.

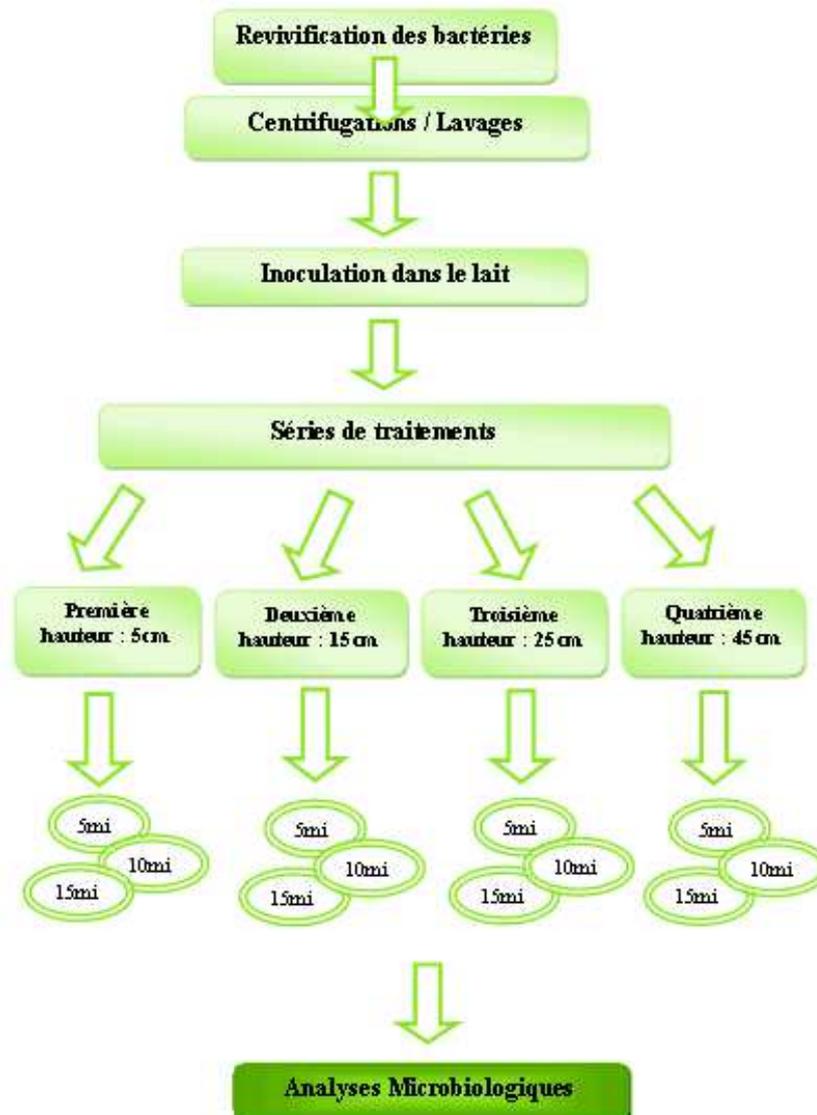


Figure III.5: Opérations de l'analyse microbiologique.

III.5 Traitement des données

Le dispositif expérimental de notre expérimentation est un factoriel complet ($4^1 \times 3^1 \times 3 \times 3$), soit 108 échantillons à analyser. Ce dispositif consiste en plusieurs traitements à quatre étages différents pour les trois bactéries, selon trois temps représentés par 5, 10 et 15 minutes avec un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$) et en triplicata.

Les analyses des données et les courbes de tendance ainsi que les coefficients de régression sont effectuées en utilisant le logiciel Excel version office 2007.

Les résultats sont analysés séparément pour chaque microorganisme par une ANOVA en utilisant le Model Linéaire Général (MLG) pour déterminer les effets significants ($p < 0,05$) et

un test de LSD (Least Significant Differences) est performé pour la séparation des valeurs moyennes, en utilisant le logiciel SPSS14 (ESI, 2013).

chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1 courbes de survie

IV.1.1 Milieu général: PCA

IV.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Le traitement effectué a été d'exposer des colonies de *Staphylococcus aureus* inoculées dans du lait écrémé, à la lumière UV-C à des temps de traitement allant de 0 à 15 minutes et à différentes distances de la source lumineuse : 5, 15, 25 et 45 cm. Avec une population initiale approximative de $9 \cdot 10^9$ CFU/ml. L'inactivation de *Staphylococcus aureus* déterminée par le comptage des cellules viables a montré que le traitement aux UV-C a une certaine efficacité dans la réduction des populations bactériennes dans le lait écrémé. Les courbes d'inactivation obtenues sont semi-logarithmiques et montrent la réduction de *Staphylococcus aureus* en fonction du temps de traitement. Il est admis que l'inactivation microbienne suit une cinétique de premier ordre et elle est due aux altérations irréversibles. Selon **Maier et al.** (2011) Le rayonnement UV germicide inactive les agents pathogènes selon l'équation de décroissance standard $S = e^{(-k \cdot I \cdot t)}$ (cinétique d'ordre); où S représente la fraction de la population d'origine qui survit à l'exposition (N/N_0 où N_0 représente la population d'origine, N population survivant au traitement) au temps t, et I représente l'intensité lumineuse.

Les travaux de **Shama** (1999) ont conclu que les survivants des traitements à la lumière UV donnent une fonction exponentielle par rapport au temps. Cependant, plusieurs courbes d'inactivation présentent des phénomènes de « tail et shoulder » (**Keyser et al.**, 2008 ; **Matak et al.**, 2007) où la fin de ces courbes correspond à une baisse d'inactivation causée par plusieurs facteurs (présence de solides en suspension qui bloquent la lumière UV, non-homogénéité du traitement, agrégation des protéines, ..)

Les courbes d'inactivation de cette étude ne montrent pas de « Tailing ». Toutefois, quelques auteurs (**Tran et Farid**, 2004 ; **Hayer**, 1998) ont observé la non-activation des microorganismes à des doses basses d'UV suivie par une relation log-linéaire aux doses élevées. Cette traîne (tailing) exprime la réparation des dommages causés par l'exposition aux UV (**Koutchma et al.**, 2009).

De plus, les résultats obtenus au cours de nos travaux montrent des différences dans les courbes représentatives des différents traitements correspondant à chaque hauteur ou distance de la source de lumière (**Figure IV.1**).

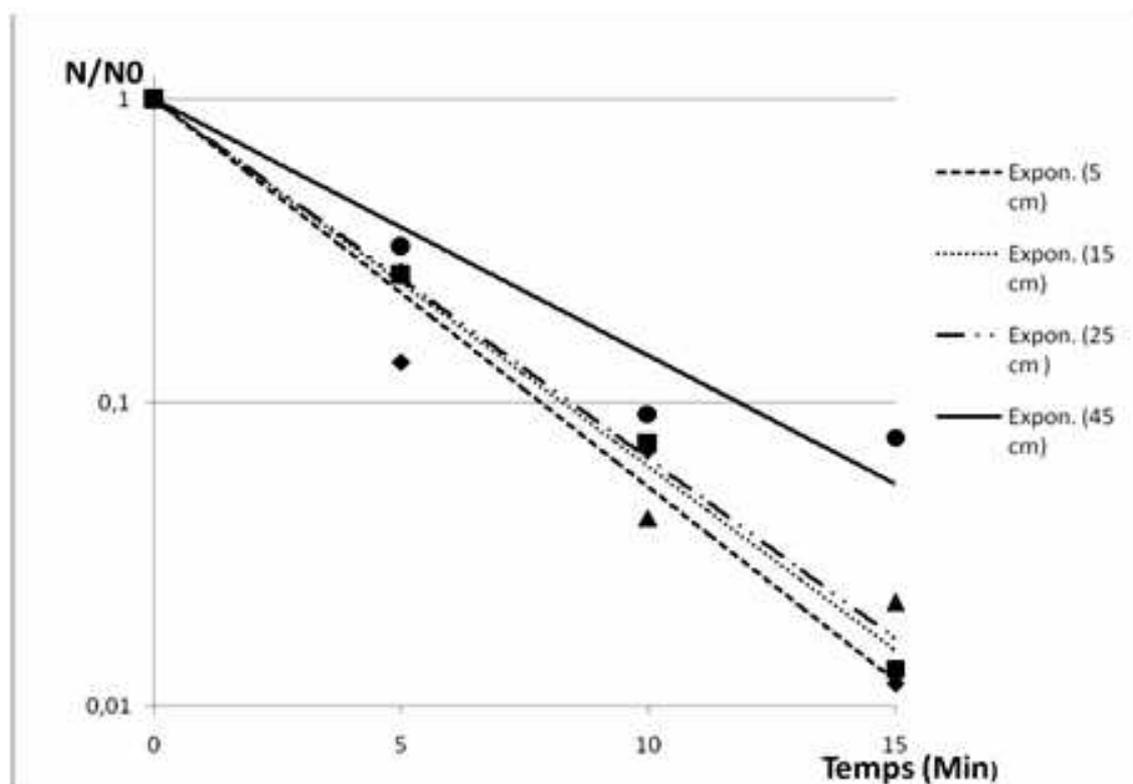


Figure IV.1: Courbes d'inactivation de *Staphylococcus aureus* (PCA), (♦) 5cm, (■) 15cm, (▲) 25cm, (●) 45cm.

Ainsi, les courbes décroissent en fonction du temps, autrement dit, le temps maximum de 15 minutes correspond à l'inactivation la plus élevée.

En analysant les résultats obtenus, nous avons constaté que la courbe correspondant à 5cm présente la constante cinétique (k) la plus élevée (0,782) comme l'indique le **Tableau IV.1**. De plus, le traitement à cette hauteur est de loin le plus efficace, comparé aux trois autres. Ceci s'explique par le fait que la dose de lumière UV-C reçue par l'échantillon soit importante si la distance par rapport à la source de lumière est réduite.

En conclusion, c'est à la plus petite distance (5cm) et au plus long temps de traitement (15 minutes) que l'inactivation est la plus importante (**Choudhary et al., 2011, Schenk et al., 2011,; Maier et al., 2009, Hardjwinata et al., 2005**).

Tableau IV.1: Caractéristiques des courbes d'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Hauteurs	Equations d'inactivation	R ²
5cm	$N/N_0 = e^{(-0,782 \text{ l.t})}$	0,964
15cm	$N/N_0 = e^{(-0,7343 \text{ l.t})}$	0,994
25cm	$N/N_0 = e^{(-0,7237 \text{ l.t})}$	0,969
45cm	$N/N_0 = e^{(-0,5169 \text{ l.t})}$	0,920

La **Figure IV.2** montre la différence de charge microbienne avant et après traitement pendant 15 minutes, sur Plate Count Agar (PCA), après une incubation de 24H à 37°C.

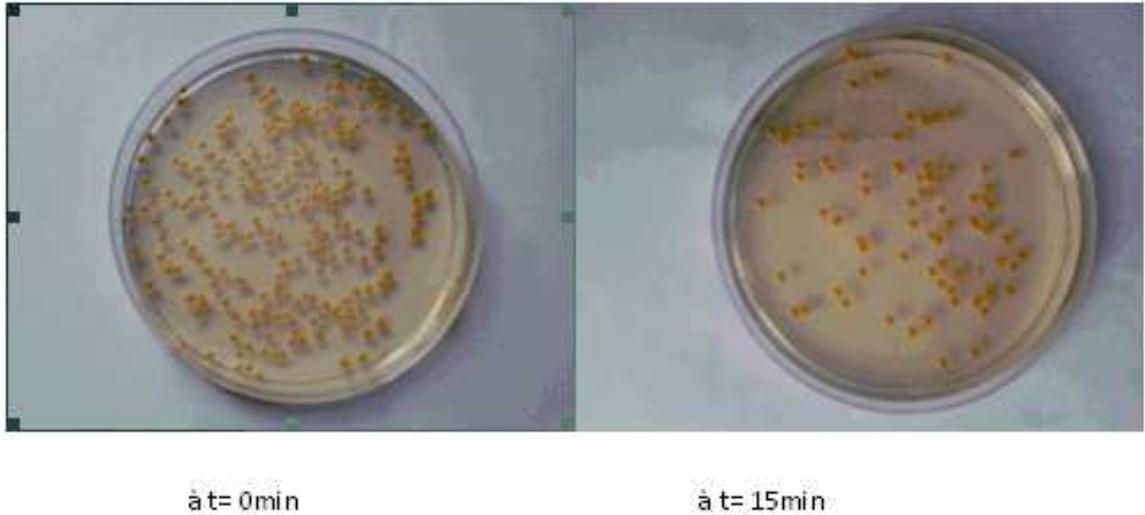


Figure IV.2: Photos des cultures de *Staphylococcus aureus* sur PCA.

IV.1.1.2 *Escherichia coli*

L'inactivation d'*Escherichia coli*, inoculée dans du lait écrémé, déterminée par le compte des cellules viables après traitement aux UV-C a varié selon les temps de traitement et les hauteurs utilisés (**Figure IV.3**).

On remarque que les courbes semi logarithmiques sont descendantes pour toutes les hauteurs, ce qui traduit une diminution remarquée pour 5, 15, 25 et 45cm. On remarque que les courbes décroissent avec l'augmentation du temps de traitement, c'est-à-dire plus ce dernier est grand, plus l'inactivation des bactéries est importante.

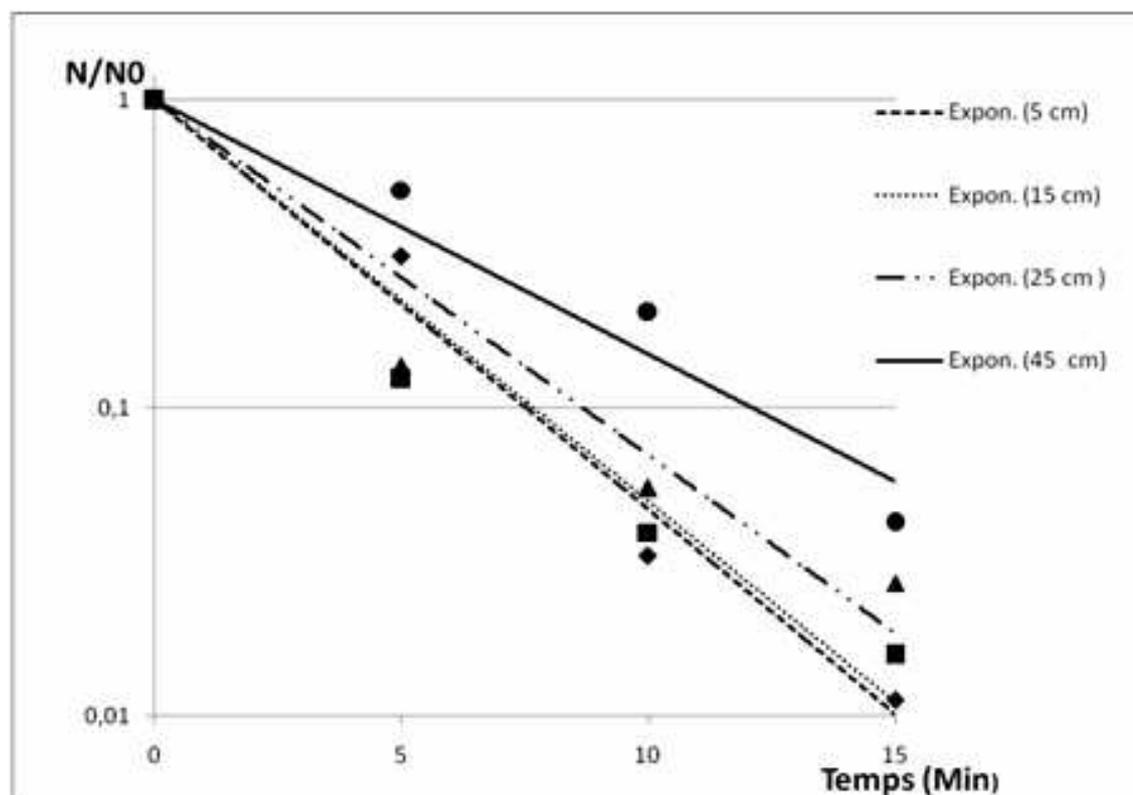


Figure IV.3: Courbe d'inactivation d'*Escherichia coli* (PCA), (◆) 5cm, (■) 15cm, (▲) 25cm, (●) 45cm.

Comme précédemment, nous avons constaté que la courbe correspondant à 5cm présente la constante cinétique (k) la plus élevée (0,786), on en conclue que plus le produit traité est proche de la source de lumière, plus le traitement est efficace (**Tableau IV.2**). En effet, l'absorbance des rayons UV-C par les aliments est proportionnelle au rapprochement de la source lumineuse (**Koutchma et al., 2009**).

Tableau IV.2: Caractéristiques des courbes d'inactivation d'*Escherichia coli*

Hauteurs	Equations	R ²
5cm	$N/N_0 = e^{(-0,7860 \text{ l.t})}$	0,9648
15cm	$N/N_0 = e^{(-0,7237 \text{ l.t})}$	0,9887
25cm	$N/N_0 = e^{(-0,6890 \text{ l.t})}$	0,913
45cm	$N/N_0 = e^{(-0,5169 \text{ l.t})}$	0,952

La **Figure IV.4** montre la différence de charge des populations survivantes avant et après traitement aux UV-C pendant 15minutes, sur Plate Count Agar, après une incubation de 24H à 37°C.

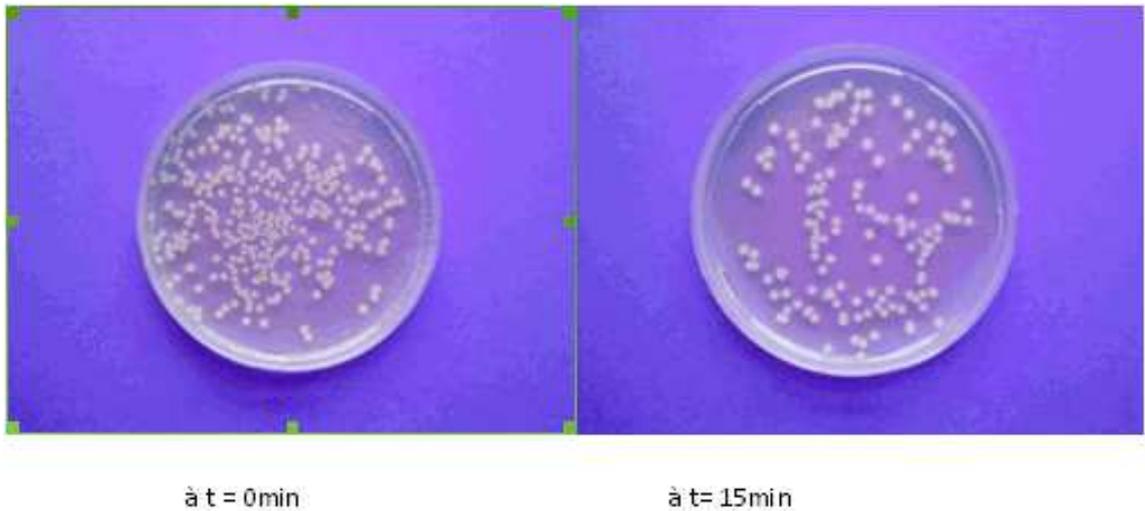


Figure IV.4: Photos des cultures d'*Escherchia coli* sur PCA.

IV.1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Comme pour les bactéries précédentes, l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*, inoculée dans du lait, a varié selon les temps de traitement et les hauteurs utilisés (**Figure IV.5**). On remarque que les courbes semi logarithmiques sont descendantes pour toutes les hauteurs, ce qui traduit une diminution pour 5, 15, 25 et 45cm les courbes décroissent avec l'augmentation du temps de traitement. Aussi, la courbe correspondant à la hauteur de 5 cm présente la constante cinétique (k) la plus élevée (0,8483) (**Tableau IV.3**). On en conclut que plus le produit traité est proche de la source de lumière, plus le traitement est efficace. En effet, l'absorbance des rayons UV-C par les aliments est proportionnelle au rapprochement de la source lumineuse (**Koutchma et al., 2009**)

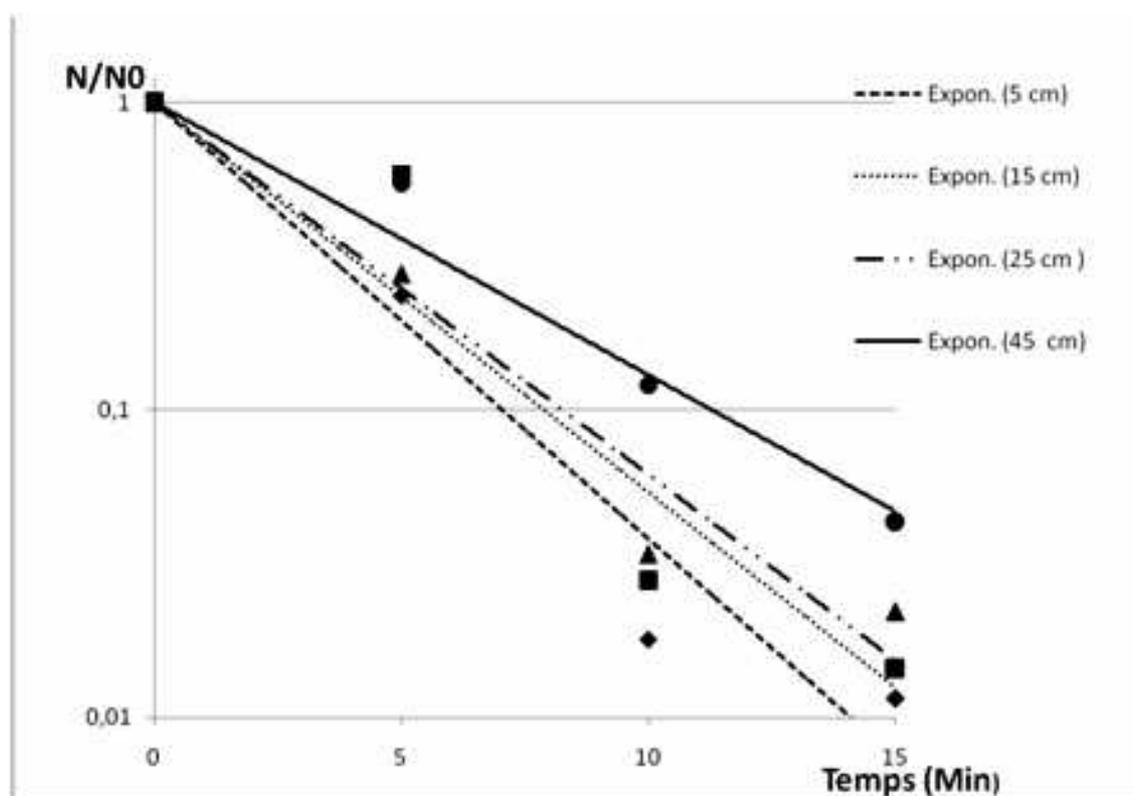


Figure IV.5: Courbe d'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* (PCA), (◆) 5cm, (■) 15cm, (▲) 25cm, (●) 45cm.

Tableau IV.3: Caractéristiques des courbes d'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

Hauteurs	Equations	R ²
5cm	$N/N_0 = e^{(-0,8483 \text{ l.t})}$	0,941
15cm	$N/N_0 = e^{(-0,7688 \text{ l.t})}$	0,903
25cm	$N/N_0 = e^{(-0,7158 \text{ l.t})}$	0,947
45cm	$N/N_0 = e^{(-0,5302 \text{ l.t})}$	0,969

La Figure IV.6 montre la différence des populations survivantes avant et après traitement aux UV-C pendant 15minutes, sur PCA, après une incubation de 24H à 37°C.

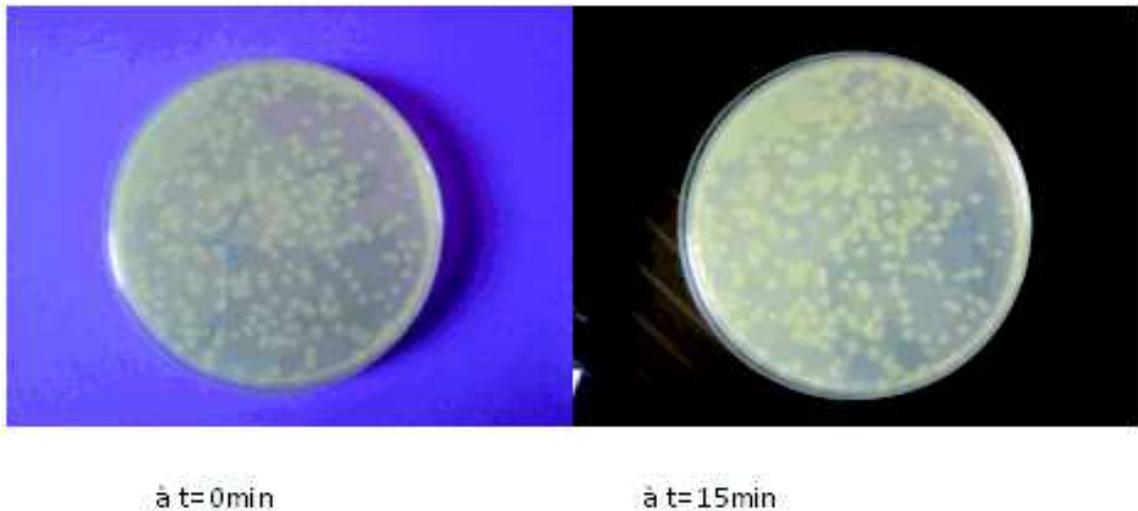


Figure IV.6: Photos des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* sur PCA.

IV.1.1.4 Comparaison des courbes de survie des trois bactéries sur milieu spécifique

L'inactivation des trois bactéries étudiées est représentée par la **Figure IV.7**. Les analyses des constantes cinétiques des courbes correspondant à chaque hauteur, ont révélé l'efficacité du traitement à la hauteur de 5 cm; donc cette dernière a été choisie pour être le point de départ de la comparaison entre les bactéries étudiées.

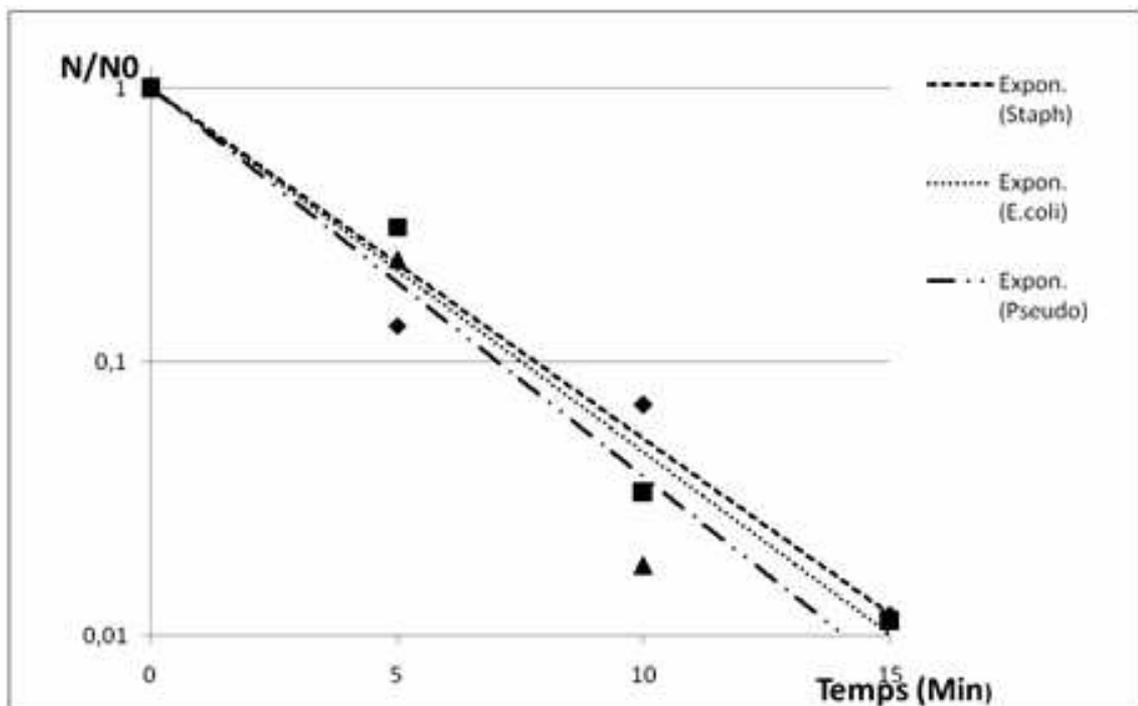


Figure IV.7: Courbes d'inactivation des trois bactéries (PCA), (♦) *Staph*, (■) *E.coli*, (▲) *Pseudo*.

Après analyse des constantes cinétiques des courbes d'inactivation, il en ressort que l'espèce la plus sensible est *Pseudomonas aeruginosa* avec la constante la plus importante

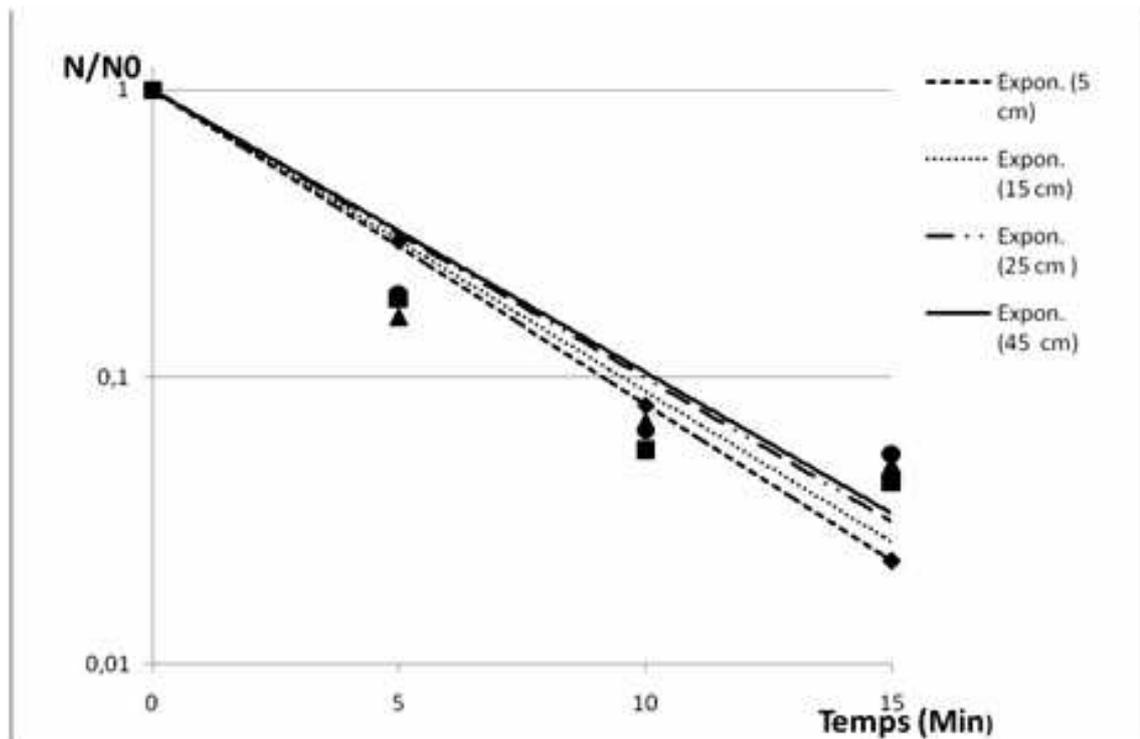


Figure IV.8: Courbe d'inactivation de *Staphylococcus aureus* (Chapman), (◊) 5cm, (■) 15cm, (▲) 25cm, (●) 45cm.

En analysant les résultats obtenus, nous avons constaté que la courbe correspondant à 5cm présente la constante cinétique (k) la plus élevée (0,6672) (Tableau IV.5). De plus, le traitement à cette hauteur est de loin le plus efficace comparé aux trois autres. Ceci s'explique par la dose de lumière UV-C reçue par l'échantillon est plus importante si la distance par rapport à la source de lumière est réduite.

En conclusion, c'est à la plus petite distance (5cm) et au plus long temps de traitement (15minutes) que l'inactivation est plus importante. Ce qui reste en accord avec les travaux de Choudhary *et al.*, 2011, Schenk *et al.*, 2011,; Maier *et al.*, 2009, Hardjwinata *et al.*, 2005).

Tableau IV.5: Caractéristiques des courbes d'inactivation de *Staphylococcus aureus*.

Hauteurs	Equations	R ²
5cm	$N/N_0 = e^{(-0,6672 \text{ l.t})}$	0,999
15cm	$N/N_0 = e^{(-0,6362 \text{ l.t})}$	0,891
25cm	$N/N_0 = e^{(-0,6097 \text{ l.t})}$	0,857
45cm	$N/N_0 = e^{(-0,5830 \text{ l.t})}$	0,870

La Figure IV.9 montre la différence de charge microbienne avant et après traitement pendant 15minutes, sur milieu Chapman, après une incubation de 24H à 37°C.

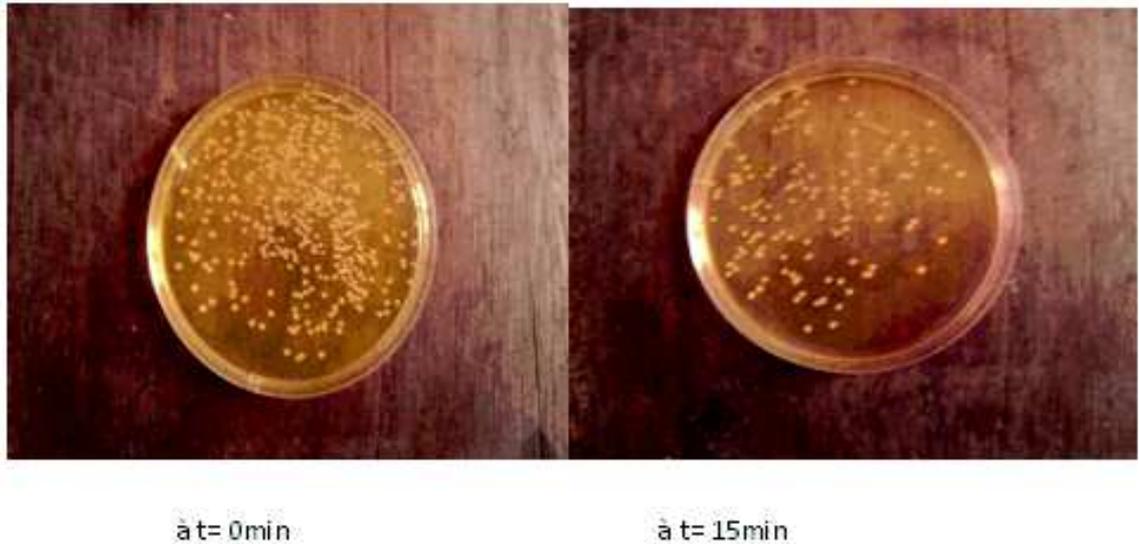


Figure IV.9: Photos des cultures de *Staphylococcus aureus* sur le milieu Chapman.

IV.1.2.2 *Escherichia coli*

Le traitement a été effectué de la même manière que dans la section (IV.1.1); en inoculant les souches après traitement, dans un milieu spécifique, qui pour *Escherichia coli*, est représenté par la gelée VRBG.

Par ailleurs, les résultats obtenus au cours de nos travaux montrent des différences dans les courbes représentatives des différents traitements correspondant à chaque hauteur ou distance de la source de lumière. Ainsi, les courbes décroissent en fonction du temps, autrement dit, le temps maximum de 15minutes correspond à l'inactivation la plus élevée (**Figure IV.10**).

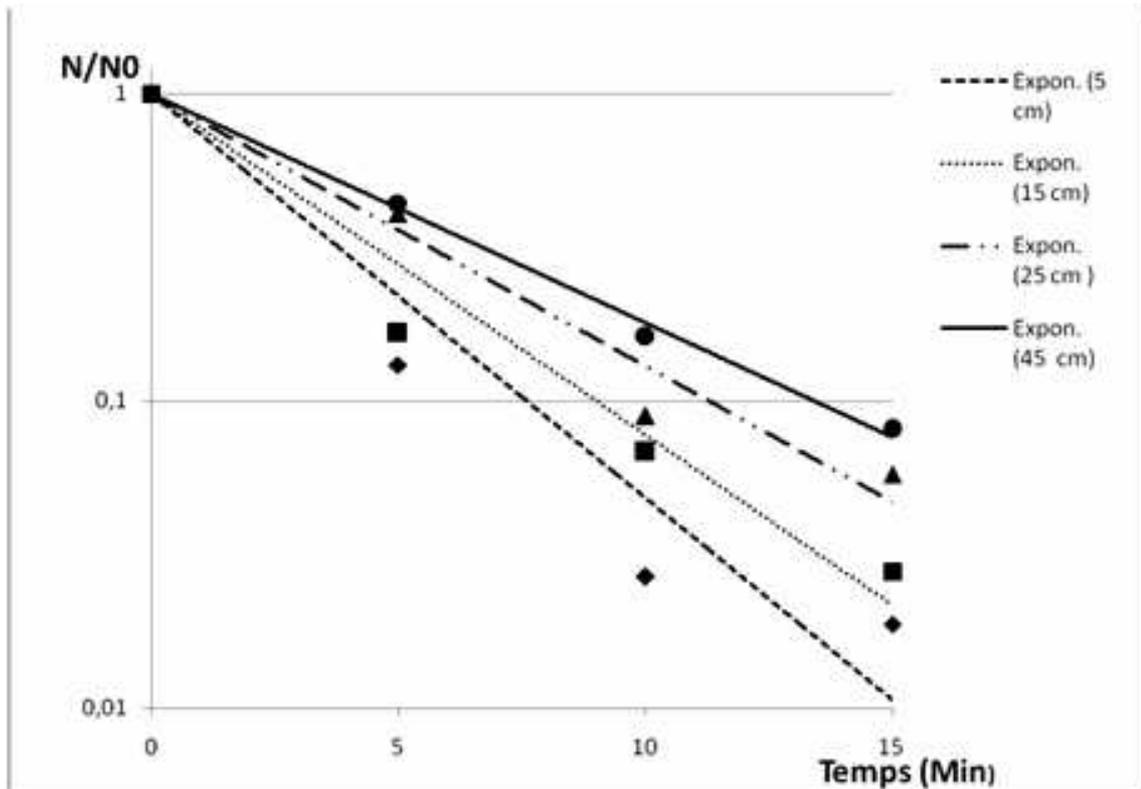


Figure IV.10: Courbe d'inactivation d'Escherichia coli (VRBG), (♦) 5cm, (■) 15cm, (▲) 25cm, (●) 45cm.

En analysant les résultats obtenus, nous avons constaté que la courbe correspondant à 5cm présente la constante cinétique (k) la plus élevée (0,795) (Tableau IV.6). De plus, le traitement à cette hauteur est de loin le plus efficace comparé aux trois autres. Ceci s'explique par la dose de lumière UV-C reçue par l'échantillon est plus importante si la distance par rapport à la source de lumière est réduite. En conclusion, c'est à la plus petite distance (5cm) et au plus long temps de traitement (15minutes) que l'inactivation est plus importante (Choudhary *et al.*, 2011; Schenk *et al.*, 2011; Maier *et al.*, 2009; Hardjawinata *et al.*, 2005).

Tableau IV.6: Caractéristiques des courbes d'inactivation d'Escherichia coli.

Hauteurs	Equations	R ²
5cm	$N/N_0 = e^{(-0,795 \text{ l.t})}$	0,904
15cm	$N/N_0 = e^{(-0,6627 \text{ l.t})}$	0,950
25cm	$N/N_0 = e^{(-0,5302 \text{ l.t})}$	0,962
45cm	$N/N_0 = e^{(-0,4506 \text{ l.t})}$	0,995

La Figure IV.11 montre la différence de la population microbienne survivante avant et après traitement pendant 15minutes, sur milieu VRBG, après une incubation de 24H à 37°C.

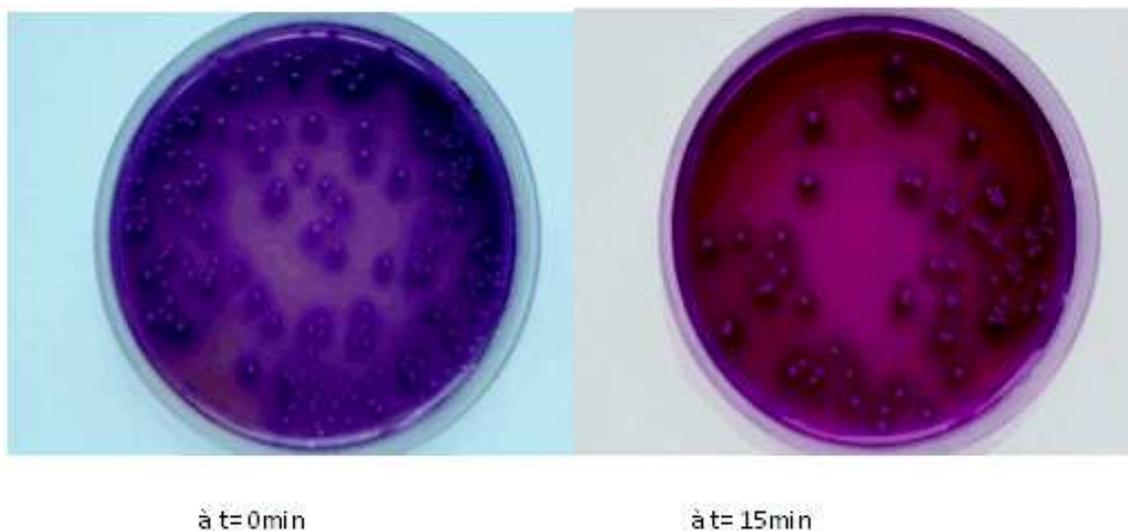


Figure IV.11: Photos des cultures d'*Escherichia coli* sur le milieu VRBG.

IV.1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Le traitement a été effectué de la même manière que dans les sections précédentes, en utilisant la gelée VRBG comme milieu spécifique.

Comme précédemment, les courbes décroissent en fonction du temps, autrement dit, le temps maximum de 15 minutes correspond à l'inactivation la plus élevée (Figure IV.12).

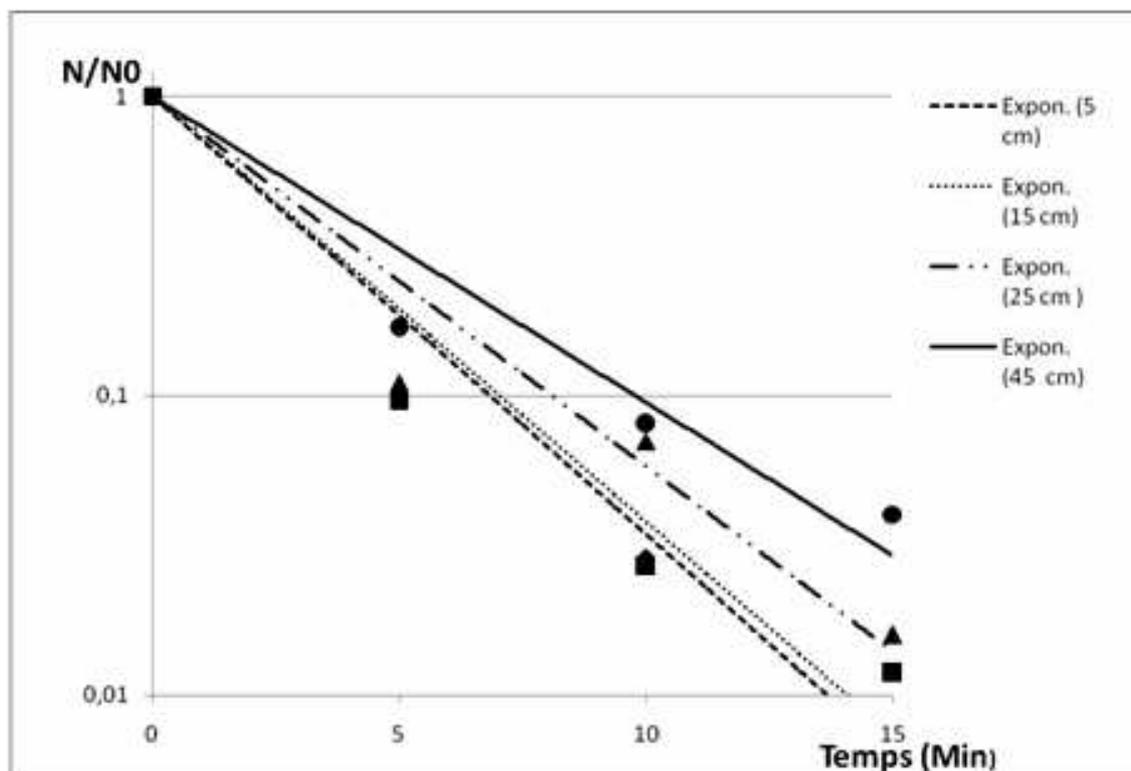


Figure IV.12: Courbe d'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* (VRBG), (♦) 5cm, (■) 15cm, (▲) 25cm, (●) 45cm.

En analysant les résultats obtenus, nous avons constaté que la courbe correspondant à 5cm présente la constante cinétique (k) la plus élevée (0,8748) (**Tableau IV.7**). Encore une fois, c'est à la plus petite distance (5cm) et au plus long temps de traitement (15minutes) que l'inactivation est plus importante.

Tableau IV.7:Caractéristiques des courbes d'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*.

Hauteurs	Equations	R ²
5cm	$N/N_0 = e^{(-0,8748 \text{ l.t})}$	R ² = 0,959
15cm	$N/N_0 = e^{(-0,8483 \text{ l.t})}$	R ² = 0,925
25cm	$N/N_0 = e^{(-0,7423 \text{ l.t})}$	R ² = 0,925
45cm	$N/N_0 = e^{(-0,6097 \text{ l.t})}$	R ² = 0,913

La **figure IV.13** montre la différence de charge bactérienne avant et après traitement pendant 15minutes, sur milieu VRBG, après une incubation de 24H à 37°C.

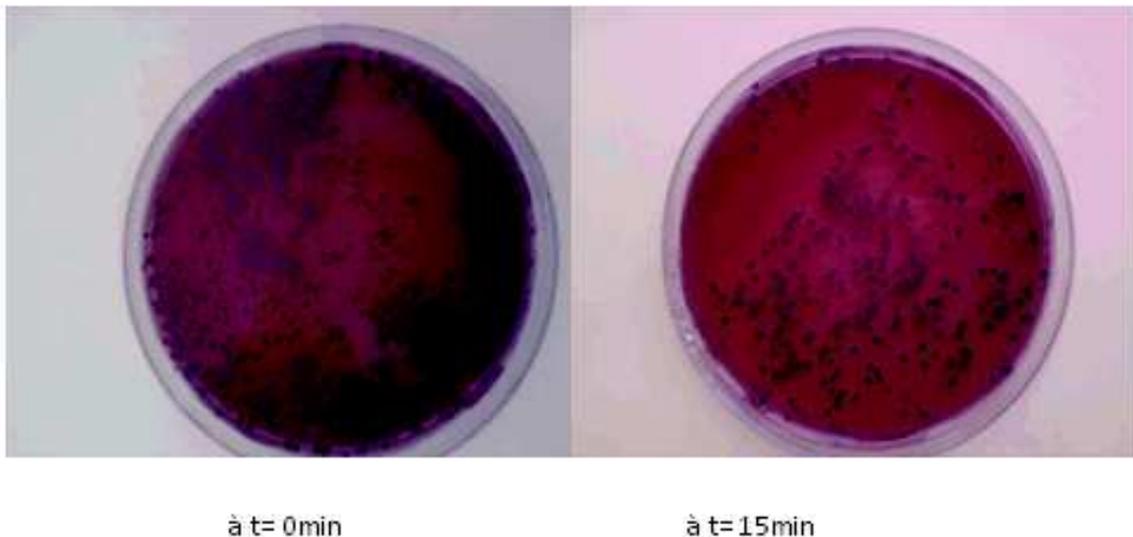


Figure IV.13: Photos des cultures de Pseudomonas aeruginosa sur le milieu VRBG.

IV.1.2.4 Comparaison des courbes de survie des trois bactéries, sur milieu spécifique

La **Figure IV.14** résume l'inactivation des 3 bactéries. Après analyse des constantes cinétiques d'inactivation de chaque bactérie, on conclue que l'espèce la plus sensible est *Pseudomonas aeruginosa* avec la constante la plus importante (k = 0,8748) suivie d'*Escherichia coli* (k' = 0,795) et enfin *Staphylococcus aureus* avec une constante égale à 0,6672 (**Tableau IV.8**).

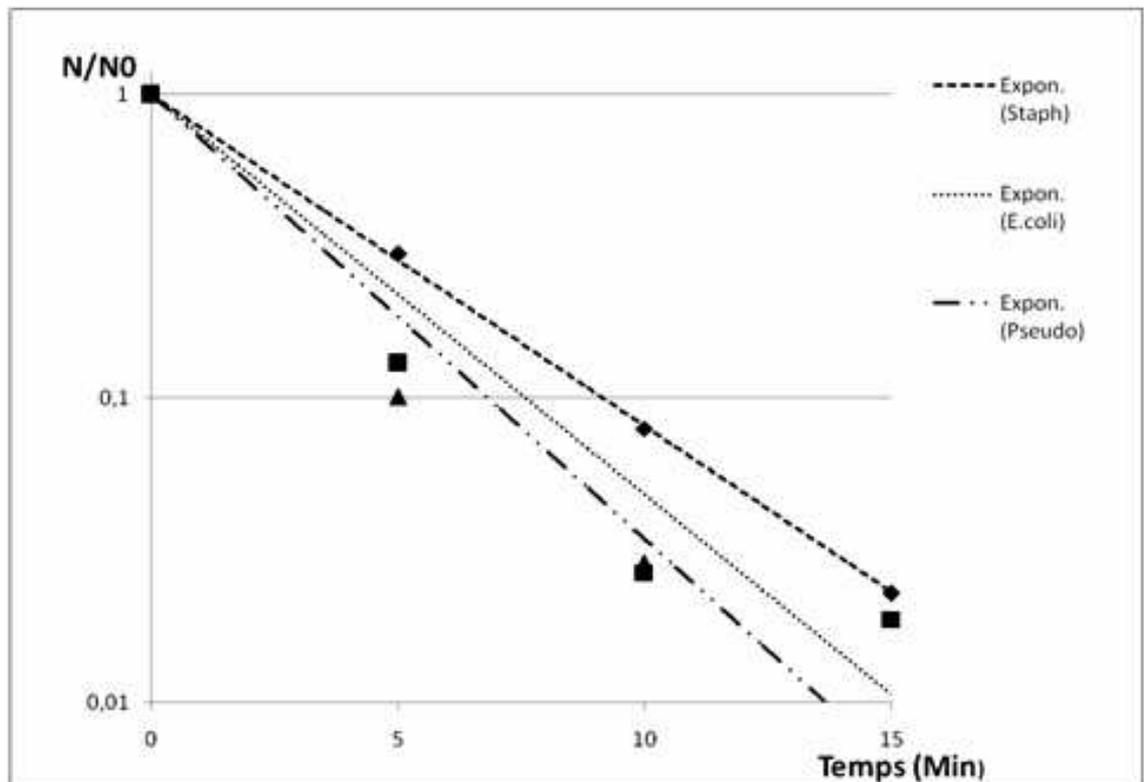


Figure IV.14: Courbe d'inactivation des 3 bactéries-comparaison, (◆) *S. aureus*, (■) *E. coli*, (▲) *P. aeruginosa*.

Tableau IV.8: Caractéristiques des courbes d'inactivation.

Hauteurs	Equations	R ²
<i>S. aureus</i>	$N/N_0 = e^{(-0,6672 \text{ l.t})}$	R ² = 0,999
<i>E. coli</i>	$N/N_0 = e^{(-0,795 \text{ l.t})}$	R ² = 0,904
<i>P. aeruginosa</i>	$N/N_0 = e^{(-0,8748 \text{ l.t})}$	R ² = 0,959

La sensibilité des 3 bactéries aux UV-C, les classent donc comme suit :

D'après **Adams et Moss** (2008) et **Montville et Matthews** (2008), La résistance des microorganismes aux UV est largement déterminée par leur capacité à réparer les dégâts causés par les rayons. Généralement, la résistance suit ce modèle :

Gram- < Gram+ ~ Levures < Spores bactériennes < Spores de moisissures < Virus

Notre étude a aussi démontré que la résistance aux UV-C des microorganismes varie d'une espèce à une autre. Nos résultats corroborent avec ceux de **Lu et al.** (2011) ; **Rowan et al.**, (1999) et **Jay** (1997), qui a rapporté que les bactéries gram-positives étaient plus résistantes aux effets de la lumière UV par rapport aux bactéries gram-négatives.

IV.2 courbes d'inactivation

IV.2.1 Staphylococcus aureus

Les résultats des traitements aux UV de *Staphylococcus aureus* sont présentés dans cette partie par l'inactivation bactérienne en fonction de la dose UV absorbée par les bactéries (Figure IV.15). Celle-ci est difficile à mesurer et résulte de l'irradiance de la lumière par rapport au temps d'exposition. Ces deux paramètres sont fortement influencés par la position des microorganismes dans le liquide traité.

Ces courbes traduisent les fractions survivantes pour différentes doses de traitement. En général, la dose UV est calculée en multipliant l'irradiance (W/cm^2) par le temps d'exposition (minutes) (Gayà *et al.*, 2011).

L'effet des UV-C sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* a été recherché utilisant un milieu sélectif (Chapman) et un milieu non-sélectif (PCA). Un rétablissement notable a donc été remarqué pour la plupart des échantillons utilisant les milieux non-spécifiques. En conséquence, les résultats décrits ci-dessus relèvent des phénomènes de rétablissement observés pour le milieu non-spécifique, alors que les résultats obtenus utilisant les milieux spécifiques sont discutés plutard.

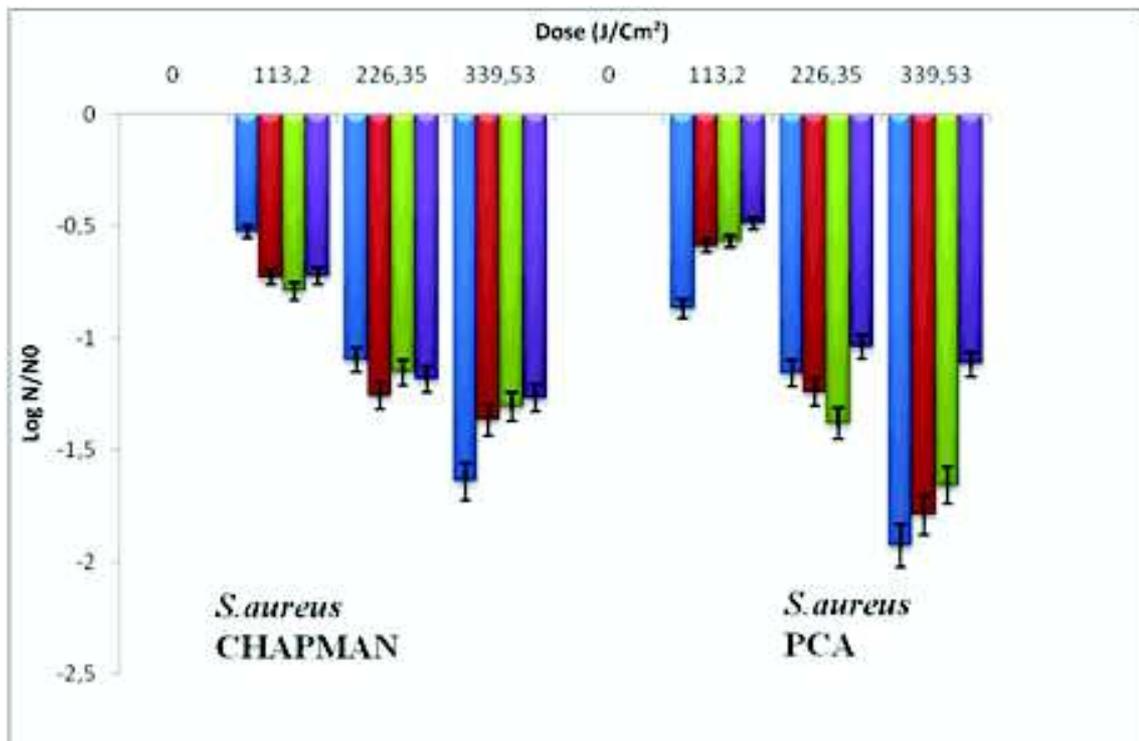


Figure IV.15: Inactivation de *Staphylococcus aureus* en Cycles logarithmiques en fonction de la dose de traitement appliquée (J/cm^2) à différentes distances, (■) 5cm, (■) 15cm, (■) 25cm, (■) 45cm.

L'exposition de *S.aureus* à une dose de $113,2 J/cm^2$ a donné différentes réductions selon la hauteur. Ainsi, le maximum a été relevé pour la hauteur de 5cm, donnant moins de 1log de réduction décimale. La deuxième dose reçue par les populations bactériennes représentée par $226,35 J/cm^2$ a donné des résultats mitigés. Enfin, $339,53 J/cm^2$ comme dose d'UV reçue a conduit à la réduction maximale. En effet, on a observé une réduction

de *S. aureus*, dans le lait écrémé, atteignant jusqu'à 2 cycles logarithmiques pour une dose de 339,53 J/cm² et à 5cm de distance.

L'analyse statistique des résultats de l'inactivation a révélé des résultats significativement différents à un intervalle de confiance 95% ($p > 0,05$).

Si on considère que l'inactivation microbienne suit une cinétique de premier ordre, on admet alors que cette inactivation est causée par une altération irréversible des cellules. Il a été démontré que l'inactivation microbienne, suite à l'exposition aux UV-C, n'est pas un événement de « tout ou rien » (All or nothing). En effet, la lumière UV absorbée par l'ADN cause des changements physiques et électriques ainsi qu'une destruction des liaisons des bases azotées qui conduit à un retard de reproduction ou à la mort cellulaire. Cependant, le cross linking dans l'ADN est proportionnel à la dose d'UV-C reçue. Les dommages de l'ADN peuvent être réparés jusqu'à certains niveaux (**Gayan et al.**, 2011)

Pour les résultats correspondant au milieu Chapman, on remarque que la combinaison de la dose maximale avec la hauteur minimale a donné la plus grande valeur de réduction, représentée par 1,7 log. Toutefois, les niveaux de rétablissement ont été bas comparés au milieu non-spécifique.

Avec un maximum de 1,926 log sur PCA et 1,8 log pour Chapman, obtenus après exposition de 339,53 J/cm², nos résultats avoisinent la valeur de 2,1 log obtenue par **Lu et al.** (2011) pour *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 inoculé dans du lait UHT écrémé et exposé à une dose de 21,7 J/cm², qui est inférieure à la nôtre car notre temps d'exposition est de loin supérieur.

Walkling-Ribeiro (2008) qui a testé l'inactivation de *Staphylococcus aureus* SST2.4 inoculé dans du jus de pomme par traitement UV-C à 26cm de distance de la source de lumière pendant 30min et a observé des résultats ne dépassant pas les 2log de réduction bactérienne, alors qu'**Ogihara et al.** (2013) ont obtenu 6log de réduction avec des traitements de 500J, entre 7 et 16cm de distance.

Néanmoins, les traitements UV appliqués dans notre étude, d'une part discontinus et d'autre part utilisant un appareillage peu sophistiqué, n'ont pas été suffisants pour inactiver avec succès *Staphylococcus aureus* dans le lait écrémé.

IV.2.2 Escherichia coli

Des concentrations cellulaires initiales approximatives de $9 \cdot 10^9$ ont été utilisées pour montrer l'effet des UV-C sur l'inactivation d'*E.coli* qui a été recherché utilisant un milieu sélectif (VRBG) et un milieu non-sélectif (PCA) pour différencier les phénomènes de rétablissement dans ce dernier selon la **Figure IV.16**.

Comme décrit précédemment, on ne prendra en compte que les paramètres donnant le maximum de réduction : la dose maximum représentée par 339,53 J/cm² ainsi que la hauteur correspondant au maximum de dose absorbée par le lait à une distance de 5cm.

L'exposition d'*E.coli* à une dose de 339,53 J/cm² a donné différentes réductions selon la hauteur, le maximum a été remarqué pour 5cm donnant moins de 1log de réduction décimale pour VRBG et presque 2log pour PCA (résultats significativement différents: $p > 0,05$).

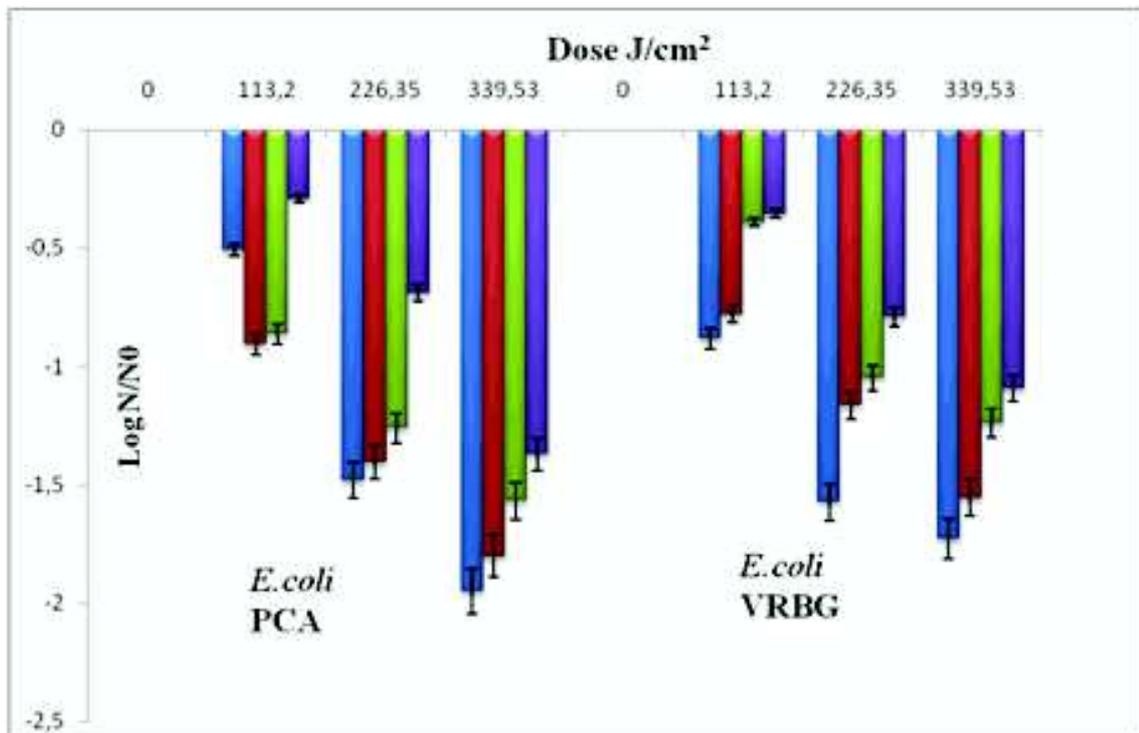


Figure IV.16: Inactivation de *Escherichia coli* en Cycles logarithmiques en fonction de la dose de traitement appliquée (J/cm^2) à différentes distances, (■) 5cm, (■) 15cm, (■) 25cm, (■) 45cm.

Pour le traitement d'*E.coli* W1485 aux UV-C, inoculée dans du lait écrémé, **Choudhary et al.** (2011) ont rapporté des inactivations allant de 0,47 à 2,43 log pour un traitement continu de quelques secondes, alors **Matak et al.** (2012) ont remarqué des réductions logarithmiques de l'ordre de 2,29 pour *E.coli* O157 : H7. Alors qu'**Unluturk et al.** (2008) notent des résultats différents après exposition d'*E.coli* ATCC 25299 à des doses entre 10-50 mJ/cm^2 pendant 60secondes en mode continu, aboutissant à 6 cycles de réduction logarithmique. Par ailleurs, l'étude de **Vermeulen et al.** (2008) qui ont aboutit à des résultats allant de 1,47 à 3,5 log pour *E.coli* ATCC 25299 inoculée dans le lait, pour une dose de 4mW/cm². Enfin, **Lu et al.** (2011) sont arrivés, quant à eux, à obtenir après traitement UV-C de 21,7 J/cm^2 pour *E.coli* 2,5 log de réduction décimale.

Dans notre étude, l'inactivation maximale pour *E.coli* est arrivée en moyenne à 1,949 log sur PCA et 1,728 log pour VRBG. Ce qui reste approximativement dans la même optique que les résultats exposés précédemment.

Cependant, la comparaison des résultats de la résistance UV est épineuse et risquée car l'équipement utilisé et l'exposition (mode, temps) détermine ces derniers (**Gayan et al.**, 2011).

IV.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Des concentrations initiales cellulaires approximatives de $8 \cdot 10^9$ ont été utilisées pour montrer l'effet des UV-C sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* a été recherché

utilisant un milieu sélectif (VRBG) et un milieu non-sélectif (PCA) pour différencier les phénomènes de rétablissement dans ce dernier selon la **Figure IV.17**.

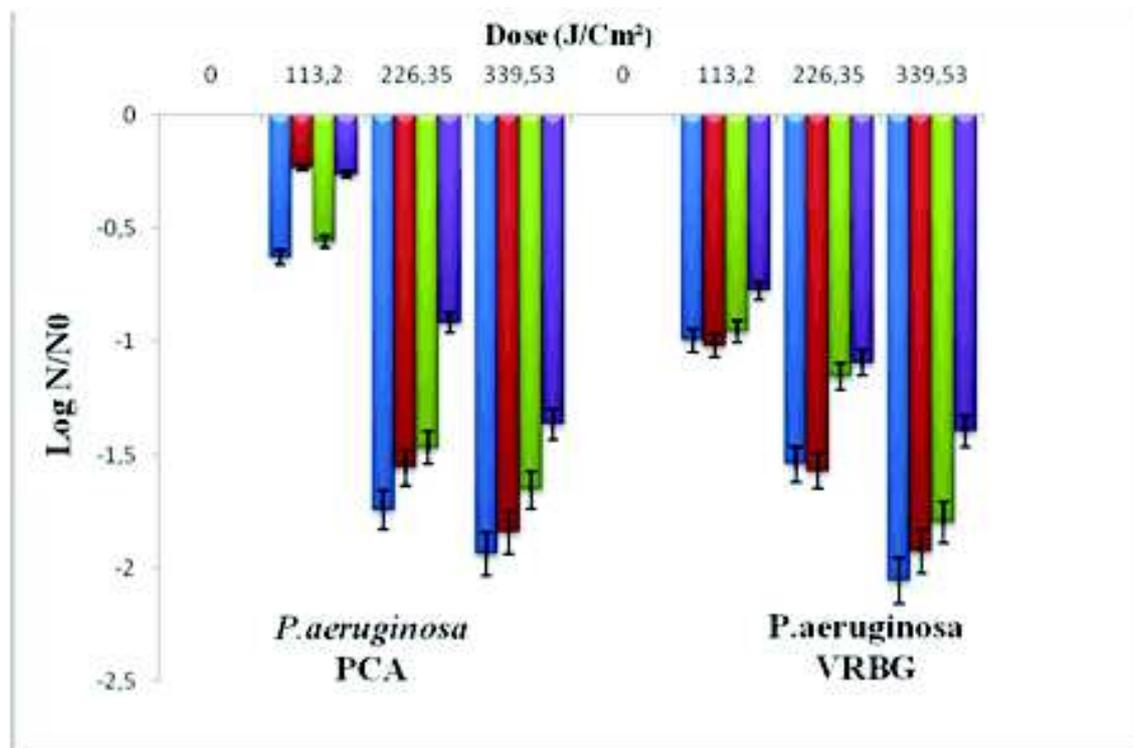


Figure IV.17: Inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* en Cycle logarithmiques en fonction de la dose de traitement appliquée (J/cm^2) à différentes distances, (■) 5cm, (■) 15cm, (■) 25cm, (■) 45cm.

Comme décrit plus haut, on ne prendra en compte que les paramètres donnant le maximum de réduction : la dose maximum représentée par $339,53 J/cm^2$ ainsi que la hauteur correspondant au maximum de dose absorbée par le lait à une distance de 5cm.

L'exposition de *P. aeruginosa* à une dose de $339,53 J/cm^2$ a donné différentes réductions selon la hauteur; le maximum a été remarqué pour 5cm avec 2,05 log de réduction décimale pour VRBG et 1,939 log pour PCA (résultats statistiquement différents : $p > 0,05$).

Lu et al. (2011) ont noté 2,2 cycles logarithmiques de réduction bactérienne après avoir testé l'inactivation de cette bactérie inoculée dans du lait UHT écrémé et exposée aux UV-C à des doses de $21,7 J/cm^2$. Alors que **Chang et al.** (2012) ont observé 4,5 log de réduction après traitement UV-C de *P.aeruginosa* présents dans l'air. L'inactivation maximale de *P. aeruginosa*, dans notre étude, est donc arrivée en moyenne à 2.05 log sur PCA et 1,939 log sur VRBG; ce qui reste relativement proche des résultats rapportés par ces auteurs.

Comme l'équipement utilisé et l'exposition (mode, temps) déterminent la résistance bactérienne aux UV, la comparaison des résultats reste délicate, comme pour *E. coli* (**Gayan et al ., 2011**).

IV.2.4 Comparaison des courbes d'inactivation des trois bactéries

L'inactivation bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* déterminée par le compte des cellules viables a montré que le traitement aux UV-C a abouti à des résultats différents pour chaque bactérie. La dose maximale de 339,35 J/cm^2 , comparée aux deux autres, donne la plus grande réduction bactérienne (comme révélé dans la section précédente), et si on compare les résultats pour chaque bactérie, on note l'efficacité du traitement à 5cm par rapport aux autres distances.

Selon la **Figure IV.18**, *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus sensible aux UV suivie d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. La résistance des microorganismes aux UV est largement déterminée par leur capacité à réparer les dégâts causés par les rayons (Adams et Moss, 2008). Notre étude a démontré que la résistance aux UV-C des microorganismes varie d'une espèce à l'autre. Ce qui confirme donc ce que rapportent Lu et al., (2011); Montville et Matthews (2008); Rowan et al., (1999) et Jay (1997). Ce dernier a aussi trouvé que les bactéries gram-positives étaient plus résistantes aux effets de la lumière UV par rapport aux bactéries gram-négatives.

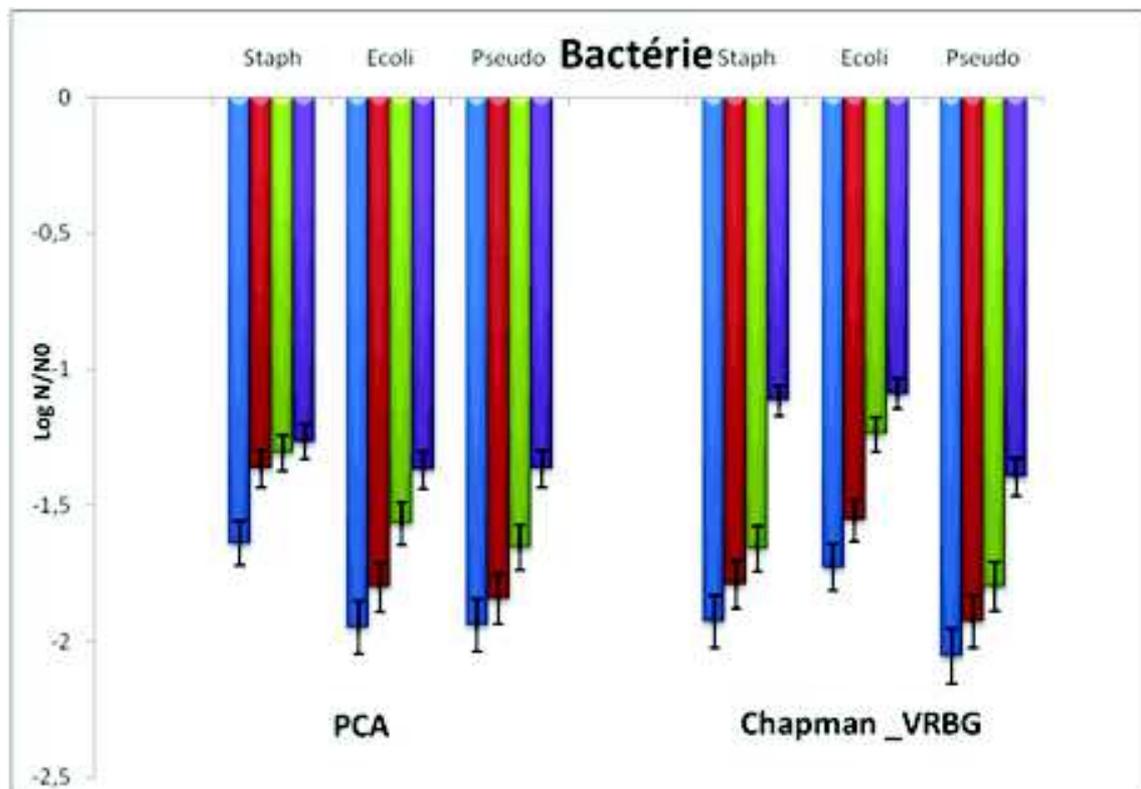


Figure IV.18: Inactivation de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, Cycle logarithmiques à une dose de traitement de 339,53 J/cm^2 appliquée à différentes distances, (■) 5cm, (■) 15cm, (■) 25cm, (■) 45cm.

Les différences de réduction bactérienne sont dues à la basse transmittance du lait et plus particulièrement à ses composantes (matière grasse, protéines..);celles-ci pourraient protéger les micro-organismes des UV-C. Les solides en suspension pourraient, aussi, être responsables de l'absorption des UV et donc les rayonnements ne peuvent être efficaces que s'ils sont directement exposés aux micro-organismes (Matak et al., 2012).

Selon **Hijen *et al.*** (2006), les causes de résistance aux UV sont multiples :

- Etat physiologique : l
- a sensibilité est reliée à la phase de croissance des bactéries, avec la plus haute sensibilité dans la phase de croissance active et moins dans la phase stationnaire ;
- Variation de la souche : plusieurs souches de la même espèce peuvent ne pas avoir la même résistance ou sensibilité aux UV-C ;
- Réparation : d'une part, l'exposition aux UV endommage les acides nucléiques de la cellule. Cependant, les microorganismes peuvent garder des fonctions métaboliques, tel que l'activité enzymatique. D'autre part Avec le temps, les organismes acquièrent un certain mécanisme de réparation de ces dommages qui résulte de l'exposition aux UV solaires. Ces mécanismes peuvent être de deux types :
 - Réparation (Dark repair) : qui ne requière pas de lumière et a déjà été démontré chez la plupart des bactéries.
 - Photoréactivation : qui se produit dans des conditions d'exposition prolongée à la lumière visible.

Les réductions, après traitement, des trois bactéries étudiées n'ont même pas atteint les 3 log, alors que la FDA (Food and Drug Administration) recommande une réduction bactérienne supérieure à 5Log CFU/ml pour la pasteurisation des aliments liquides (**Bandla *et al.***, 2012). Ce qui nous amène à dire que le traitement discontinu aux UV, demeure, à notre niveau, incomplet. Ceci peut s'expliquer par la difficulté notable de garantir l'efficacité de la technologie des UV pour atteindre 5Log cycles d'inactivation (**Gayán *et al.***, 2012).

CONCLUSION

Dans ce travail nous avons testé l'efficacité du traitement aux rayons Ultraviolet C sur l'inactivation de trois bactéries, à savoir *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Celles-ci ayant été inoculées dans du Lait Ecrémé, puis exposées durant des temps allant de 5 à 15 minutes, correspondant à des doses évoluant dans un intervalle de 113 à 339 J/cm². Ces traitements ont été performés à différentes distances de la source lumineuse (5, 15, 25 et 45cm). Les bactéries, ont ensuite été inoculées sur deux types de milieux: le premier, non-sélectif correspondant au PCA et le deuxième sélectif, Chapman pour *S.aureus*, et VRBG pour les deux autres bactéries.

A la lumière de cette étude, les résultats obtenus nous conduisent aux conclusions suivantes :

- D'une part, le maximum d'inactivation a été obtenu à la distance de 5cm d'éloignement de la source lumineuse, la dose maximale étant de 339,53 J/cm² durant un temps d'exposition de 15 minutes.
- D'autre part, avec 2,05 log de réduction décimale enregistrée, *P. aeruginosa* reste l'espèce la plus sensible aux rayons UV-C, suivie par *E.coli* (1.949 log) et enfin *S.aureus*(1,7 log).

Les réductions, après traitement, des trois bactéries étudiées n'ont même pas atteint les 3 log, alors que la FDA (Food and Drug Administration) recommande une réduction bactérienne supérieure à 5Log CFU/ml pour la pasteurisation des aliments liquides (**Bandla et al .**, 2012). Ce qui nous amène à dire que le traitement discontinu aux UV, demeure, à notre niveau, incomplet. Ceci peut s'expliquer par la difficulté notable de garantir l'efficacité de la technologie des UV pour atteindre 5Log cycles d'inactivation (**Gayan et al .**, 2012).

La technologie des ultraviolets est cependant une technologie propre, économique et compacte. Elle n'utilise aucun produit chimique, ne nécessite pas d'eau, et permet une décontamination microbiologique efficace, applicable à plusieurs domaines industriels. Ainsi, elle peut être développée ou couplée à un traitement thermique, ce qui permettrait de gagner en énergie, ou encore utilisée en traitement continue aboutissant, ainsi à plus d'efficacité.

Enfin, la technologie des UV pulsés ou également appelée « lumière pulsée » peut être une alternative au traitement du lait, car cette dernière préserve les qualités organoleptiques et nutritionnelles du liquide à traiter sans causer aucun dégât.

Peut-être a-t-on là le début d'un nouveau siècle des Lumières..

Références bibliographiques

- Adams M.R., Moss M.O., 2008.** Food Microbiology. 3rd Ed. RSC publishing, United Kingdom, 463p.
- Alexandre E.M.C., Brandao T.R.S., Silva C.L.M., 2012.** Emerging technologies to improve the safety and quality of fruits and vegetables. Novel technologies in food science, food chain7, n.12, p.p. 261-298.
- Alzamora S.M., Welti-phanes J., Guerrero S.N., Gomez P.L., 2012.** Rational use of novel technologies: A comparative analysis of the performance of several new food preservation technologies for microbial inactivation. Novel technologies in food science, Food chain7, p.p. 235-301.
- Amiali M., Ngadi M.O., 2012.** Microbial decontamination of food by pulsed electric fields (PEFs). In Microbial decontamination in the food industry, 804p.
- Anonyme, 2009.** Avis sur le développement de nouvelles technologies dans la fabrication, le conditionnement et la conservation des denrées alimentaires : Conséquences, responsabilités des opérateurs et acceptabilité sociale, Caisse Nationale de l'alimentation, avis n.65, 55p
- Anonyme, 2011.** Bulletin de veille "Techno". Veille technologique ADRIA Normandie/ laline+, n.48, 25p.
- Anonyme, 2011.** Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Journal of food science- Supplement, 108p.
- Appert N., 1810.** L'Art de conserver pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales. Paris
- Bandla S., Choudhary R., Watson D.G., Haddock J., 2012.** UV-C treatment of soymilk in coiled tube Uv reactors for inactivation of *Escherichia coli* W1485 and *Bacillus cereus* endospores. LWT- Food Science and Technology, n.46, p.p. 71-76.
- Bchir B., 2011.** Contribution à l'étude de la conservation des graines de grenade (*Punicagranatum* L.) par deshydratation osmotique. Thèse de Doctorat. Université de Liège, 212p.
- Benabbou A.K.,Derriche Z., Felix C., Lejeune P., Guillard C., 2007.** Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature and intensity of UV irradiation. Applied catalysis B: Environmental, n.76, p.p. 257-263.
- Bermudez- Aguirre D., Patrick Dunne C., Barbarosa-casanova G., 2011.** Effects of processing parameters on inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk using pulsed electric fields. International Dairy journal, n.24, p.p. 13-21.
- Bermudez-Aguirre D., Barbosa- Casnovas G.V., 2011.** Recent advances in Emerging Nonthermal Technologies. Food engineering interfaces, Food engineering series, Springer science, p.p.285-320.

- Birmpa A., Sfika V., Vantarakis A., 2013.** Ultraviolet light and Ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, n.6226, p.p.1-7.
- Boumendjel M., 2005.** Conservation des denrées alimentaires: Cours multimedia interactif à usage pédagogique. Centre universitaire d'El Tarf, 60p.
- Boulimi L., Stambouli M., Ben Braiek E., Zisis G, Cambronne J.P., 2012.** High power discharge lamps and their photochemical applications: An evolution of pulsed radiation, Intech, 282p.
- Buzrul S., 2008.** High hydrostatic pressure (HHP) applications in food science: a study on compression heating, microbial inactivation kinetics, pulsed pressure and high pressure carbon dioxide treatments, University of Bordeaux, 147p.
- Calders A., 2009.** Le 'high pressure food processing ou la pasteurisation à froid. PROCESS Secteur alimentaire, Industrie Technique Et Management, p.p.91-94.
- Caminiti I.M. et al., 2012.** The effect of Ultraviolet light on microbial inactivation and quality attributes of apple juice. *Food Bioprocess Technology*, n.5, p.p. 680-386.
- Cantwell R.E., Hofmann R., 2008.** Inactivation of indigenous coliform bacteria in unfiltered surface water by UV light. *Water research*, n.42, p.p. 2729-2735.
- Castillo- Ledezma J.H., Sanchez Salas J.L., Lopez-Malo A., Bandala E.R., 2011.** Effect of pH, solar irradiation and semiconductor concentration on photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* in water using nitrogen-doped TiO₂. *Eur Food Res Technol*, n.233, p.p. 825-834.
- Chang C.W., Li S.Y., Huang S.H., Huang C.K., Chen Y.Y., Chen C.C., 2012.** Effects of Ultraviolet germicidal irradiation and swirling motion on airborne *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* under various relative humidities. *Indoor air*, n.23, p.p. 74-84.
- Char C.D., Mitilinaki E., Guerrero S.N., Alzamora S.M., 2010.** Use of high intensity ultrasound and UVC light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food Process Biotechnology*, n.3, p.p.797-803.
- Cheigh C.I., Park M.H., Chung M.S., Shin J.K., Park Y.S., 2012.** Comparison of intense pulsed light and Ultraviolet (UVC) induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. *Food control*, n.25, p.p. 654-659.
- Chen P. et al., 2010.** Non-thermal food pasteurization process. An introduction. In case studies in novel food processing technologies, 529p.
- Choudhary R., Bandla S., Watson D.G., Haddock J., Abughazaleh A., Bhattacharya B., 2011.** Performance of coiled tube ultraviolet reactors to inactivate *Escherichia coli* W1485 and *Bacillus cereus* endospores in raw milk and commercially processed skimmed cow milk. *Journal of food engineering*, n.107, p.p. 14-20.
- Chung et al., 2009.** Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surface and Coating technology*, n.203, p.p. 1081-1085.
- Cilla A. et al., 2012.** Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids and ascorbic acid from milk and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS publications, n.60, p.p. 7282-7290.

- Codex Alimentarius, 2003.** General standard for irradiated foods, Codex Stan 106-1983. rev n.1-2003, p.p. 1-3
- Coohill, T. P., Sagripanti, J. L., 2008.** Overview of the inactivation by 254 nm ultraviolet radiation of bacteria with particular relevance to biodefense. *Photochemistry and Photobiology*, n.84, p.p. 1084-1090.
- Corrales M., De souza P.M., Stahl M.R., Fernandez A., 2012.** Effects of the decontamination of a fresh tiger nuts' milk beverage (Horchata) with short wave Ultraviolet treatments (UV-C) on quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, n.13, p.p. 163-168.
- Cullen P.J., Tiwari B.K., Valdramidis V.P. ed., 2012.** Novel thermal and nonthermal technologies for fluid foods, Elsevier, 526p.
- Cuq J.I., 2010.** Microbiologie alimentaire : Contrôle microbiologique des aliments— Manuel technique. Polytech Département Sciences et Technologie des Industries Alimentaire, Montpellier, 120p.
- Daryaei H., Balasubramanian V.M., 2012.** Microbial decontamination of food by high pressure processing. In *Microbial decontamination in the food industry*, 804p.
- Deeth H.C., Datta N., 2011.** Non-thermal technologies: Introduction. Elsevier, 725p.
- Demirci A., Ngadi M.O., 2012.** Microbial decontamination in the food industry: Novel methods and applications. Woodhead publishing series in Food Science, Technology and Nutrition, n.234, 804p.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J., 2004.** New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, n.14, p.p.273-285.
- Donaghy J., Keyser M., Johnston J., Cilliers F.P., Gouws P.A., Rowe M.T., 2009.** Inactivation of *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* in milk by UV treatment. *Letters in applied microbiology*, n.49, p.p. 217-221.
- Doona C.J., Kustin K., Feeherry F.E., 2010.** Case studies in Novel food processing technologies. *Innovations in processing, packaging and predictive modeling*. Woodhead publishing series in food science, Technology and Nutrition, n.197, 528p.
- Dubourg K., Lacouture E., 2007.** Les traitements par UV. *AFTH, Bulletin d'information*, n.19, p.p.27-31.
- Elmansser N., Orange N., Bakhrouf A., Federighi M., 2007.** La lumière pulse, un nouveau procédé de conservation des aliments: *Revue bibliographique. Revue medico-vétérinaire*, n.158, p.p.274-282.
- Engin B., Karagulyuceer Y., 2011.** Effects of Ultraviolet light and Ultrasound on microbial quality and aroma-active components of milk. *Society of Chemical Industry*, n.92, p.p.1245-1252.
- Exapro, 2010.** From <http://www.exapro.com> .
- Falguera V., Pagan J., Garza S., Garvin A., Ibarz A., 2011.** Ultraviolet processing of liquid food: A review. Part2: Effects on microorganisms and on food components and properties. *Food Research International*, n.44, p.p. 1580-1588.
- Federighi, M., Tholozan, J. L., 2001.** Traitements ionisants et hautes pressions des aliments. 300p.

-
- Fellows P., 2000.** Food processing technology: Principle and practice. 2nd Ed. Woodhead publishing, CRC Press, 529p.
- Ferrandon P., 2008.** Les Aliments Irradiés. From <http://www.criirad.org> .
- Fonseca J.M., Rushing J.W., 2006.** Effect of Ultraviolet –C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. Post-harvest Biology and Technology, n.40, p.p.256-261.
- Frakas, J. 2007.** Physical methods of food preservation. In food microbiology: Fundamentals and frontiers, p.p. 685-712
- Gayán E. et al., 2012.** Pasteurization of apple juice contaminated with *Escherichia coli* by a combined UV-mild temperature treatment. Food Bioprocess Technology, n.6, 11p.
- Gayán E., Alvarez I., Condon S., 2013.** Inactivation of bacterial spores by UV-C light. Innovative food science and emerging technologies, 6p.
- Gayán E., Monfort S., Alvarez I., Condón S., 2011.** UV-C inactivation of *Escherichia coli* at different temperatures. Innovative Food Science and Emerging Technologies, n.12, p.p. 531-541.
- Gayán E., Serrani M.J., Monfort S., Alvarez I., Condon S., 2012.** Combining Ultraviolet light and mild temperatures for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. Journal of Food Engineering, n.113, p.p. 598-605.
- Geng J. et al., 2008.** Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UVspectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, n.70, p.p.1151-1155.
- Geveke D.J., Torres D., 2012.** Pasteurization of grapefruit juice using a centrifugal ultraviolet light irradiation. Journal of food engineering, n.111, p.p. 241-246.
- Gongora-Nieto, M. M., Sepulveda, D. R., Pedrow, P., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B.G., 2002.** Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie-Food Science and Technology, n.35, p.p.375-388.
- Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V., 2004.** Advantages and limitations on processing foods by UV light. Food Science and Technology International n.10, p.p. 137- 147.
- Guevara M., Tapia M.S., Gomez-Lopez V.M., 2012.** Microbial inactivation and quality of guava and passion fruit nectars treated by UV-C light. Food Bioprocess Technology, n.5, p.p.803-807.
- Guneser O., Karagulyuceer Y., 2012.** Effects of Ultraviolet light on water- and fat-soluble vitamins in cow and goat milk. American Dairy Science Association, n.95, p.p.6230-6241.
- Hijen W.A.M., Beerendonk E.F., Medema G.J., 2006.** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. Water research, n.40, p.p.3-22.
- Hillegas, S.L., Demirci, A., 2003.** Inactivation of *Clostridium sporogenes* in clover honey by pulsed UV-light treatment. The CIGR Journal of AE Scientific Research and Development, p.p.1-7. Manuscript FP 03-009.
-

- Hoyer, O., 1998.** Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. *Water Supply*, n.16, p.p.424–429.
- Huang E., Mittal G.S., Griffith M.W., 2006.** Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. *Biosystem engineering*, n.94, p.p. 403-413
- Jay J.M., 1997.** Radiation protection of foods and nature of microbial radiation resistance, p.p. 373–394. In: Jay JM (ed) *Modern food microbiology*. Springer Science and Business Media, New York
- Jun S., Irudayaraj J.M., 2009.** Food processing operations modeling: Design and analysis. 2nd Ed. CRC Press, 350p.
- Keklic N.M., Demirci A., 2012.** Microbial decontamination of food by Ultraviolet and pulsed UV light. In *Microbial decontamination in the food industry*, 804p.
- Kempkes M.A., 2010.** Pulsed electric field (PEF) systems for commercial food and juice processing. In *case studies in novel food processing technologies*, 529p.
- Keyser M., M#ller I.A., Cilliers F.P., Nel W., Gouws P.A., 2008.** Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, n.9, p.p. 348-354.
- Koutchma T., 2009.** Advances in Ultraviolet light Technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food bioprocess Technology*, n.2, p.p. 138-155.
- Koutchma T.N., Forney L.J., Moraru C.I., 2009.** Ultraviolet light in food technology: Principles and applications, CRC press, 261p.
- Kowalski W., 2009.** Ultraviolet germicidal irradiation handbook, n.1, 300p
- Krishnamurthy K., Tewari J.C., Irudayaraj J., Demirci A., 2011.** Microscopic and spectroscopic inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and Infrared heating. *Food Bioprocess Technology*, n.3, p.p. 93-104.
- Kuda T., Iwase T., et al., 2012.** Resistances to UV-C irradiation of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in wet and dried suspensions on surface with egg residues. *Food control*, n.23, p.p. 485-490.
- Labas M.D., Brandi R.J., Martin C.A., Cassano A.E., 2006.** Kinetics of bacteria inactivation employing UV-C radiation under clear water conditions. *Chemical engineering Journal*, n.121, p.p. 135-145.
- Lelieveld H.L.M., Notermans S., de Hann S.W.H. Ed, 2007.** Food preservation by pulsed electric fields. Woodhead publishing limited. Cambridge England, 363p.
- Levy C., 2012.** Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et de pays du Vaucluse. Université de Montpellier II. INRA France, 186p.
- Levy C., Aubert X., Lacour B., Carlin F., 2010.** "Relevant factors of the decontamination by Pulsed Light in the food industry". 22nd International ICFMH Symposium, Food Micro 2010.
- Levy, C., Bornard, I., Carlin, F., 2011.** Deposition of *Bacillus subtilis* spores using an airbrush-spray or spots to study surface decontamination by pulsed light. *Journal of Microbiological Methods*, n.84, p.p.3-227.

-
- Lu G., Li C., Liu P., 2011.** UV inactivation of milk-related microorganisms with a novel electrodeless lamp apparatus. *Eur Food Res Technology*, n.233, p.p. 79-87.
- Mafart P., 1996.** Génie industriel alimentaire. 2^{ème} Ed. Tome I. Les procédés physiques de conservation, Lavoisier, Tec & Doc, 341p.
- Maier I., Plum U., 2009.** Inactivation de bactéries, virus et autres agents pathogènes par rayonnement UVC dans la gamme cryostat Leica. *Escope*, 22p.
- Maktabi S., Watson I., Parton R., 2011.** Synergistic effect of UV, laser and microwave radiation or conventional heating on *E.coli* and on some spoilage and pathogenic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, n.12, p.p. 129-134.
- Maquenie D., Lammertyn J., Geeraerd A.H., Soontjens C., 2002.** Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of food Microbiology*, n.74, p.p. 27-35.
- Matak K.E., Sumner S.S., Hovingh E., Worobo R.W., Hacknet C.R., Pierson M.D., 2011.** Inactivation by UV irradiation of *Escherichia coli* in milk of different temperatures and milk fat percentage, 15p
- Menetrez M.Y., Foarde K.K., Dean T.R., Betancourt D.A., 2010.** The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chemical Engineering Journal*, n.157, p.p. 443-450.
- Mimouni A., 2007.** La décontamination des aliments par lumière pulse: Effets sur les qualités organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires des aliments. *La lettre scientifique de l'Institut français pour la nutrition*, n.121, 8p
- Moeller, R., Horneck, G., Facius R., Stackebrandt E., 2005.** Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology*, n.51, p.p. 231-236.
- Montville T.J., Matthews K.R., 2008.** *Food Microbiology: An introduction*. 2nd Ed, Washington D.C., 428p.
- Morales-De la Peña M., Elez-Martinez P., Martin-Belloso O., 2011.** Food preservation by pulsed electric fields : An engineering perspective. *Food engineering revue*, n.3, p.p.94-107.
- Morgan F., 2000.** Procédés non-thermiques de décontamination : Applications et perspectives d'utilisation pour les produits laitiers caprins. *Centre de Ressources et Documentation Caprine. L'égide*, n.20, 3p.
- Ngadi M.O., Bin Latheef M., Kassama L., 2012.** Emerging technologies for microbial control in food processing. *Green technologies in food production and processing, Food engineering series*, n.14, p.p.363-403.
- Ngadi M.O., Smith J.P., Cayouette B., 2003.** Kinetics of ultraviolet light: Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in liquid foods, *Journal of science of food and agriculture*, n.83, p.p.1551-1555.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P. 2000.** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, n.64, p.p.548-572.
-

- Ogihara H. et al., 2013.** Inactivation of food related microorganisms in liquid environment by pulsed xenon flash light treatment system. *Food Control*, n.33, p.p. 13-19.
- Ohlsson T., Bengtsson N., 2010.** Minimal processing technologies in the food industry. Woodhead publishing in Food Science and Technology, n.72, 288p.
- Orlowska M. et al., 2013.** Continuous and pulsed Ultraviolet light for nonthermal treatment of liquid foods. Part I: Effects on quality of fructose solution, apple juice and milk. *Food Bioprocess Technology*, n.6, p.p.1580-1592.
- Ortega-Rivas E., 2012.** Nonthermal food engineering operations. Food engineering series, n9, p.p. 217-230
- Pal A., Pehkonen S.O., Yu L.E., Ray M.B., 2007.** Photocatalytic inactivation of Gram positive and Gram negative bacteria using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, n.186, p.p.35-341.
- Pala C.U., Toklucu, 2013.** Effects of UV-C light processing on some quality characteristics of grape juices. *Food Bioprocess Technology*, n.6, p.p.719-725.
- Palgan I. et al., 2010.** Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food microbiology*, n.28, p.p. 14-20.
- Petit B., Ritz M., Federighi M., 2012.** Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments: revue bibliographique. 1ère partie: Les champs électriques et magnétiques pulses, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Revue médicale-vétérinaire, n.153, vol.8-9, p.p. 547-556.
- Porlet T., 2010.** Electropermeabilisation de systèmes modèles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, 236p.
- Prokopov T., Tanchev S., 2004.** Methods of food preservation. University of food technologies, Bulgaria, p.p.1-23.
- Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R., Devlieghere, F., 2010.** Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *Journal of Food Engineering*, n.100, p.p. 446-451.
- Ramaswamy R., Krishnamurthy K., Jun S., 2012.** Microbial decontamination of food by Infrared (IR) heating. In *Microbial decontamination in the food industry*, 804p.
- Raybaudi-Massilia R., Calderon-Gabaldon M., Mosqueda-Melgar J., Tapia M., 2013.** Inactivation of *salmonella enterica* serovar *Poona* and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut "Maradol" red papaya (*Carica papaya* L.) treated with UV-C light and malic acid. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, n.8, p.p. 37-44.
- Riedel C., Aubert X., Levy C. (2010) "**Claranor sterilization purified**". 14th June. _ www.claranor.com
- Rosset P., Rosset R., 1996.** Les ultraviolets germicides: Utilisation en industries agro-alimentaires. *Actualités scientifiques et techniques en I.A.A.*, n.48, 12p.
- Rowan N.J, MacGregor S.J., Anderson J.G., Fouracre R.A., Mcilvaney L., Farish O., 1999.** Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. Application of environment *Microbiology*, n.65, p.p. 1312–1315.

-
- Ruan L. F. et al., 2004.** Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology*, n.27, p.p. 286- 289.
- Sadat T., 2004.** Do we need X-rays? *Radiation Physics and Chemistry*, n.71, p.p. 545-549.
- Sampedro F., Fan X., Rodrigo D., 2010.** High hydrostatic pressure processing of fruit juices and smoothies: research and commercial application. In case studies in novel food processing technologies, 529p.
- Santos A.L. et al., 2013.** Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch Microbiology*, n.195, p.p. 63-74.
- Schenk M., Raffellini S., Guerrero S., Blanco G.A., Alzamora S.M., 2011.** Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: Study of cell injury by flow cytometry. *LWT-Food Science and Technology*, n.44, p.p. 191-198.
- Engel M., Erkaya T, Ba#lar M., Ertugay F.M., 2011.** Effect of photosonation treatment on inactivation of total and coliform bacteria in milk. *Food control*, n.22, p.p. 1803-1807.
- Shama G., 1999.** Ultraviolet light. *Chemical engineering*, Academic press, p.p. 2208-2214.
- Sheelamary M., Muthukumar M., 2011.** Ozone in inactivating *Listeria monocytogenes*, *World J Young researchers*, n.3, p.p. 40-45
- Simmons et al., 2012.** Development of a hydrodynamic model for the UV-C treatment of turbid food fluids in a novel “Sure Pure Turbulator” swirl tube reactor. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, n.14, p.p. 122-134.
- Simmons M.J.H. et al., 2012.** Development of a hydrodynamic model for the UV-C treatment of turbid food fluid in a novel “Sure Pure turbulator” swirl tube reactor. *Innovative food science and emerging technologies*, n.14, p.p. 122-134.
- Singh H., Waungana A., 2011. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*, n.11, p.p. 543-551.
- Smithers G.W., 2008.** Technologies de transformation non thermiques et qualité des produits laitiers. Méthodes de transformation autres que thermiques : Impact sur la qualité du produit, Semaine en sciences et technologie du lait, Université de Laval, session 4, 2p.
- Sommers C.H. 2012.** Microbial decontamination of food by irradiation. In *Microbial decontamination in the food industry*, 804p.
- Steriflow thermal processing, 2010.** From <http://www.steriflow.com/en> .
- Syamaladevi R.M. et al., 2012.** Inactivation of *Escherichia coli* population on fruit surfaces using UV-C light: Influence of fruit surfaces characteristics. *Food Bioprocess Technology*, n.6, 15p.
- Teixeira A.G.V. et al., 2013.** Heat and Ultraviolet light treatment of Colostrum and hospital milk characteristics and calf health and growth parameters. *The Veterinary Journal*, n.197, p.p.175-181.
-

- Tran, M.T.T., Farid, M., 2004.** Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, n.5, p.p.495–502.
- Ukuku D.O., Geveke D.J., 2010.** A combined treatment of UV-light and Radio frequency electric field for the inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, n.138, p.p.50-55.
- Unluturk S., Atilgan M.R., Baysal A.H., Tari C., 2008.** Use of UV-C radiation as a non-thermal process for liquid egg products (LEP). *Journal of food engineering*, n.85, p.p. 561-568.
- Vermeulen N., Keeler W.J., Nandakumar K., Leung K.T., 2008.** The bactericidal effect of ultraviolet and visible light on *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, n.3, vol.99, p.p.550-557.
- Vignola C.L. ed. 2010.** Science et technologie du lait ; Transformation du lait. Fondation de technologie laitière du Québec inc, Presses internationales polytechniques, 600p.
- Walkling-Ribiero M., Doci F., Cronin D.A., Reiner J., Lyng J.G., Morgan D.J., 2008.** Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by Ultraviolet irradiation, pre-heating and Pulsed Electric Fields. *Journal of food engineering*, n.89, p.p.267-273.
- Weihs P., Schmalweiser A.W., Schauburger G., 2013.** Uv effects on living organisms. *Environmental Technology, Science and Technology*, n.22, p.p.609-690.
- Woodling, S. E., Moraru, C. I., 2005.** Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *Journal of Food Science*, n.70, p.p. 345-351.
- Wu, Y., Mittal, G. S. & Griffiths, M. W., 2005.** Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials. *Biosystems Engineering* 90, p.p.1-7.
- Wurtele M.A., Kolbe T., Lipsz M., 2011.** Application of GaN-based ultraviolet light emitting diodes-UV LEDs- for water disinfection. *Water research*, n.45, p.p.1481-1489.
- Yeo S.K., Liong M.T., 2012.** Effects and applications of sublethal ultrasound, electroporation and Uv radiations in bioprocessing. *Ann Microbiology*, n.8, 12p.
- Yun J., Yan R., Fan X, Gurtler J., Phillips J., 2013.** Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp and potential surrogate bacteria on apricot fruit, following exposure to UV-C light. *International Journal of Food Microbiology*, n.6277, 33p.
- Zhao W., Yang R., 2011.** Pulsed electric field induced aggregation of food proteins: Ovalbumin and bovine serum albumin. *Food bioprocess technology*, n.5, p.p. 1706-1714.